

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vnitřní struktura balkánského refugia na modelu

Erinaceus roumanicus

Internal structure of the Balkan refugium using *Erinaceus*

***roumanicus* as a model organism**

Kristýna Eliášová

Vedoucí práce: Mgr. Barbora Černá Bolfíková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Pavel Hulva, Ph.D.

Praha 2014

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury,
pod vedením školitele a konzultanta práce.

V Praze dne 14. 8. 2014

Kristýna Eliášová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Mgr. Barboře Černé Bolfíkové, PhD. za odborné vedení této práce a veliké úsilí, které do něho vložila. Především bych jí ale chtěla poděkovat za to, že mě dokázala nadchnout pro tuto práci a motivovala mne k dalšímu pokračování. S respektem k tomu, jak lze věci zvládat.

Velký dík patří také konzultantovi této práce RNDr. Pavlovi Hulvovi, PhD. za pomoc a konstruktivní připomínky k textu a směřování práce.

Díky patří Mgr. Janu Štundlovi za pomoc při vytváření grafických příloh využívajícím Geografického Informačního Systému a Ing. Monice Večerkové za pomoc s formálními úpravami textu. A samozřejmě rodině a kamarádům za psychickou podporu.

Také bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na sběru materiálu, bez kterého by tato studie nebyla uskutečnitelná.

Obsah

Obsah	4
Abstrakt	6
Abstract.....	7
1. Úvod	8
1.1. Balkánský poloostrov	8
1.1.1. Geologické a klimatické procesy ovlivňující biotickou diverzitu.....	8
1.1.1.1. Terciér.....	8
1.1.1.2. Kvartér.....	9
1.1.2. Balkánský poloostrov a koncept „refugia-in-refugia“	10
1.1.2.1. Subrefugia temperátního typu lesa	10
1.1.2.2. Genetická strukturovanost živočichů odpovídající subrefugiím	13
1. 2. Druh <i>Erinaceus roumanicus</i>	15
1.2.1. Fylogenetika, historie a rozšíření druhu	15
1.2.2. Rekolonizace Evropy.....	17
1.2.3. Ekologie druhu	18
1.2.3.1. Habitatová preference.....	18
1.2.3.2. Velikostní variabilita	18
1.2.4. Popsané morfotypy Balkánu versus molekulárně určené linie.....	19
1.2.5. Paleontologický záznam druhu.....	23
2. Materiál a metody.....	24
2.1. Vzorky	24
2.2. Izolace DNA.....	35
2.3. Mikrosatelity.....	35
2.3.1. PCR.....	35
2.3.2. Fragmentační analýza.....	38
2.4. Analýza mikrosatelitových dat.....	38
2.4.1. Charakteristika genetické variability	38
2.4.2. Genetická struktura.....	39
2.4.3. Krajinná genetika.....	40
3. Výsledky.....	42
3.1. Detekce nulových alel	42
3.2. Genetická variabilita jednotlivých lokusů	42

3.3. Genetická variabilita populací	46
3.4. Bayesiánská klastrová analýza	47
3.5. Faktoriální korespondenční analýza	49
3.6. Krajinná genetika.....	52
3.6.1. Geneland.....	52
3.6.2. Alleles In Space	54
4. Diskuze	59
4.1. Charakteristika studie	59
4.2. Oblasti kontinuálního výskytu druhu a refugiální populace.....	60
4.3. Oblasti osídlené během postglaciální expanze	61
4.4. Oblasti sekundárního kontaktu s druhem <i>E. europeaus</i>	61
4.5. Ostrovní populace.....	63
4.6. Poddruhy Balkánského poloostrova	64
4.7. Distribuce genetické variability	65
4.8. Závěr.....	67
5. Literatura	68
Příloha.....	77

Abstrakt

Tato práce byla zaměřená na popis prostorové distribuce genetické variability ježka východního (*E. roumanicus*) zejména v rámci Balkánského poloostrova a střední Evropy, neboť tyto oblasti jsou klíčové pro pochopení vlivů pleistocénních oscilací klimatu na genetickou architekturu druhu. Na základě této prostorové distribuce byly vytvořeny hypotézy ohledně možné strukturovanosti balkánského refugia. K analýze bylo použito celkem 260 jedinců a 9 mikrosatelitových lokusů. S pomocí postupů krajinné a populační genetiky bylo identifikováno několik možných izolovaných subpopulací v rámci zkoumaného areálu. Unikátní se ukázala být populace původem z Kréty, ovlivněná patrně mechanismy ostrovní evoluce. Výrazněji odlišná od zbytku areálu se jeví také populace z České republiky, nacházející se v sekundární kontaktní zóně s druhem *E. europeus*, kde se mohou projevovat mezidruhově interakce a případná introgrese. V oblasti Rumunska a oblasti jihu Balkánského poloostrova byly identifikovány největší genetické distance mezi jedinci, související s výskytem geografických bariér a možnou přítomností glaciálního subrefugia. Další identifikované subpopulace pocházely z oblasti Slovenska a Maďarska, Slovinska, Chorvatska a Bosny a Hercegoviny, Rumunska a jihu Balkánského poloostrova.

Klíčová slova: Balkánský poloostrov, *Erinaceus roumanicus*, glaciální refugium, mikrosatelity, populační struktura, krajinná genetika.

Abstract

The aim of this work was to describe the spatial distribution of genetic variability of the northern white-breasted hedgehog (*E. roumanicus*), mainly within the Balkan Peninsula and Central Europe, as these areas are crucial for understanding the effects of Pleistocene climate oscillations on the genetic architecture of the species. Based on this spatial distribution, hypotheses about the possible structuring of the Balkan refugia were formulated. A total of 260 individuals and 9 microsatellite loci were used for the analysis. Using the approach of landscape and population genetics several possible isolated subpopulations within the area surveyed were identified. Unique status was proved for a population originating from Crete, probably influenced by mechanisms of island evolution. Differences from the rest of the range were ascertained also in population from the Czech Republic, located in a secondary contact zone with the *E. europeus*. The role of interspecific interactions and possible introgression should be considered in this case. In the area of Romania and the area south of the Balkan Peninsula the highest genetic distances between individuals were identified, probably associated with the occurrence of geographical barriers and the possible presence of glacial subrefugia. Other identified subpopulations originated from regions of Slovakia and Hungary, Slovenia, Croatia and Bosnia and Herzegovina, Romania and south of the Balkan Peninsula.

Key word: Balkan Peninsula, *Erinaceus roumanicus*, glacial refugium, microsatellites, population structure, landscape genetics.

1. Úvod

1.1. Balkánský poloostrov

Balkánský poloostrov sloužil v období glaciálů jako refugium pro mnoho temperátních druhů rostlin i živočichů, byl významným zdrojem jejich genetické diverzity, a umožnil jim v období interglaciálů expandovat do severních částí Evropy. Přesto je z biologického hlediska stále nejméně prozkoumaným evropským poloostrovem, ač není pochyb, že se Balkán počtem rostlinných i živočišných druhů a vysokou mírou endemismu řadí mezi evropská centra biodiverzity (Kryštufek & Reed 2004). To je ovlivněno mnoha abiotickými a biotickými faktory - Balkánský poloostrov je topograficky nejvíce členitou krajinou v Evropě - téměř 70% povrchu Balkánu tvoří hornatá krajina (Reed et al. 2004). Tento fakt, spolu s extrémní variabilitou klimatu, komplikovanou geologickou historií a stálým výskytem lesa v některých oblastech během kvartérních oscilací klimatu (Tzedakis 1993), má vliv na současnou biodiverzitu a nepochybně ovlivnil i prostorovou distribuci druhů v glaciálním refugiu.

1.1.1. Geologické a klimatické procesy ovlivňující biotickou diverzitu

1.1.1.1. Terciér

Geologické procesy, které přímo formovaly Balkánský poloostrov, počaly v Terciéru, kdy nastala kolize a následná subdukce afro-arabské a euroasijské desky. Tato kolize vyvolala alpinské vrásnění, které dalo vznik Středozemnímu moři a topograficky zformovalo Balkánský poloostrov (Reed et al. 2004).

Důležitou událostí pro celou mediteránní oblast byla takzvaná Messinská salinitní krize, která nastala během Miocénu. Následkem spojení Afriky a Evropy v oblasti Gibraltaru došlo k izolaci Středozemního moře a ztrátě spojení s okolními vodními tělesy, které vedlo až k jeho vyschnutí (Mather 2009). Středozemní oblast byla v tomto období tvořena solnými jezery obklopenými pouštěmi a to až do opětovného plnění Středozemního moře, které nastalo počátkem Pliocénu s otevřením Gibraltaru (Hsü et al. 1977). Tato událost a její konsekvence - tvorba pevninských mostů, aridizace a ochlazení klimatu (Hsü et al. 1977) dalekosáhle ovlivnila faunu i flóru středozemní oblasti (Hulva et al. 2004, Veith et al. 2003).

Tehdy také došlo ke spojení Krétského ostrova s pevninou, které se od té doby již neopakovalo i přes značný pokles mořské hladiny během pleistocénních ledových dob (Schule 1993).

Zdá se navíc pravděpodobné, že Messinská salinitní krize vedla ve svých důsledcích (zvýšení albeda, expanze oceánských ledovců) k počátku střídání glaciálních cyklů, které charakterizují Kvartér (Hsü et al. 1977).

1.1.1.2. Kvartér

Kvartérní klimatické oscilace, které začaly před 2,4 miliony let, měly dalekosáhlý vliv na současnou distribuci a evoluci flóry a fauny (Hewitt 2000). Evropa je z tohoto pohledu unikátní svou geografii - přítomností tří poloostrovů, oddělených mořem od afrického kontinentu, znemožnila rozmanitým druhům rostlin a živočichů unikat před zaledněním dále na jih a zároveň je efektivně separovala v refugiích na jednotlivých poloostrovech, popř. i jinde (Deffontaine et al. 2005, Schmitt & Varga 2012).

Ve většině případů docházelo pouze k omezenému nebo vůbec žádnému kontaktu mezi populacemi jednotlivých poloostrovů a ty se tak vyvíjely individuálně (Schmitt 2007). Opakování ledových dob pak způsobovalo opětovnou restrikcí areálu temperátních druhů následovanou rekolonizací severních částí Evropy. Je třeba vzít v úvahu, že hladina moře byla v obdobích glaciálů níže než dnes, neboť mnoho vody bylo vázáno v ledovcích, a plocha poloostrovů tak byla rozsáhlejší. Při posledním glaciálním maximu před 20 000 lety tak byla hladina Středozemního moře o 120 metrů níž, než je tomu dnes (Stewart & Morhange 2009). Kromě nízkých teplot byl důležitým faktorem, ovlivňujícím v období glaciálů distribuci mnoha druhů rostlin i živočichů, také nedostatek srážek a celkově suché klima (Schmitt 2007).

Podle nálezů z období glaciálů bylo složení mediteránní fauny zřejmě směsí termofilních mediteránních druhů stejně jako tundrových a horských druhů, bez geografické separace mezi těmito různorodými elementy (Blondel 2009). Na základě toho lze usuzovat, že glaciální krajina byla tvořena kaleidoskopem habitatů jako je tundra, step, jehličnatý i temperátní opadavý les, tedy krajinou pro nás obtížně představitelnou, neboť nemá v současnosti analogii (Huntley & Birks 1983).

1.1.2. Balkánský poloostrov a koncept „refugia-in-refugia“

1.1.2.1. Subrefugia temperátního typu lesa

Teorie ohledně rozdělení jednotlivých mediteránních refugií na subrefugia (později nazvaná konceptem „refugia-in-refugia“) byla navrhována např. Reinigem již v roce 1950 na základě palynologických dat (Schmitt 2007).

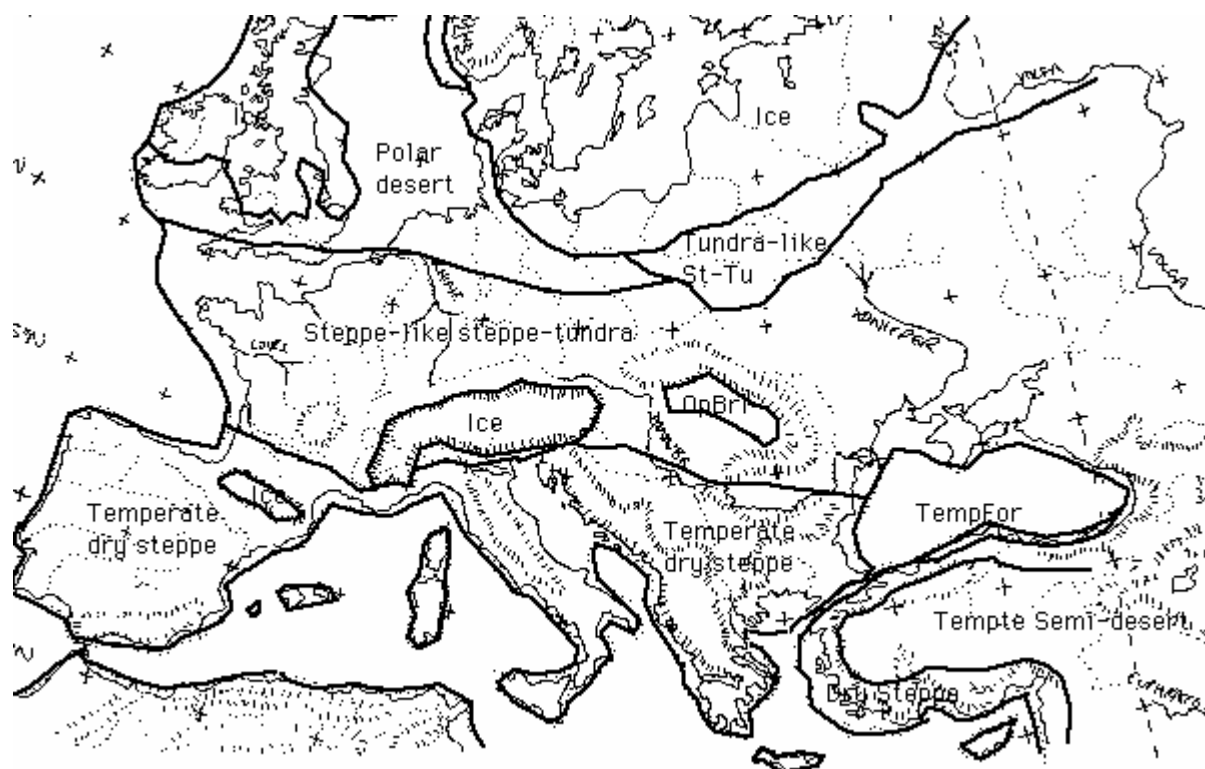
Následující palynologické výzkumy potvrdily nespojitý výskyt lesa v období glaciálů, nicméně také jeho kontinuální existenci v období glaciálů i interglaciálů v určitých oblastech s vyšším objemem srážek, jako je například pohoří Pindos v severozápadním Řecku (Tzedakis 1993). Topografická variabilita biotopu hraje v tomto přežívání stromů důležitou roli, neboť umožňovala jejich latitudinální migraci a zajistila tak vhodné mikroklimatické podmínky pro jejich přežití (Bennett et al. 1991). Z těchto subrefugií následně docházelo k expanzi druhů severně, část populace zde nicméně přetrvávala i průběhem meziledových dob (Tzedakis 2004).

Balkánskými oblastmi, kde palynologický záznam svědčí o přítomnosti temperátních druhů stromů během posledního glaciálního maxima (LGM) (18 000 př. n. l.), jsou Tanaghi Philippon v severovýchodním Řecku, jezero Xinias, povodí jezera Kopais v centrálním Řecku a zmíněné pohoří Pindos poblíž města Ioannina. Profil z povodí slovinské řeky Ljubljanice zahrnuje druhy *Pinus*, *Picea* a *Betula*, temperátní druhy v období LGM chybějí, jsou ovšem přítomné před a po tomto období (Tzedakis 2004).

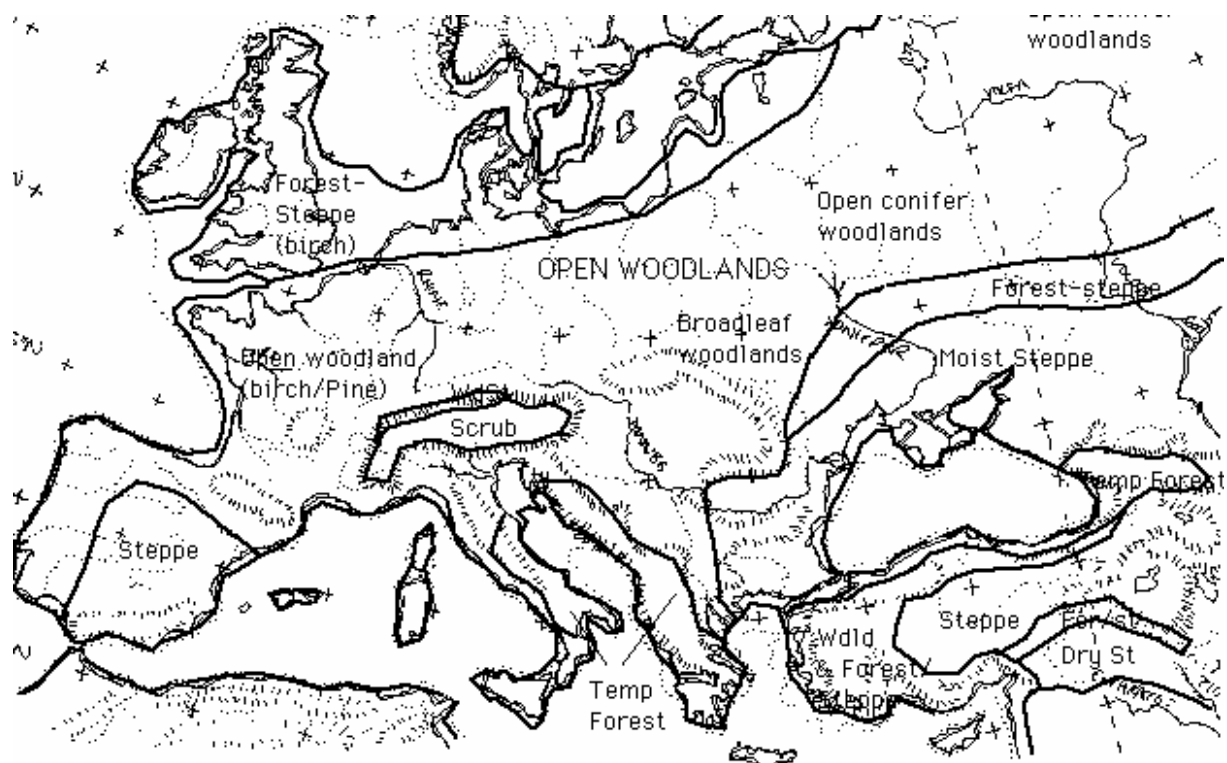
V případě dubu rodu *Quercus* byla pomocí palynologie identifikována dvě nezávislá subrefugia - Řecko a západní pobřeží Černého moře (Brewer et al. 2002). King & Ferris (1998) na základě genetické analýzy chloroplastové DNA druhu *Alnus glutinosa* odhalili unikátní haplotypy pro oblast Řecka a oblast Bulharska.

Pro období posledního glaciálního maxima lze tedy předpokládat přítomnost opadavého lesa v horských a pobřežních oblastech na jihu poloostrova, přičemž dvě prozatím identifikovaná subrefugia v rámci Balkánu se nacházejí v západním Řecku a ve východním Bulharsku poblíž Černého moře (Tzedakis 2004).

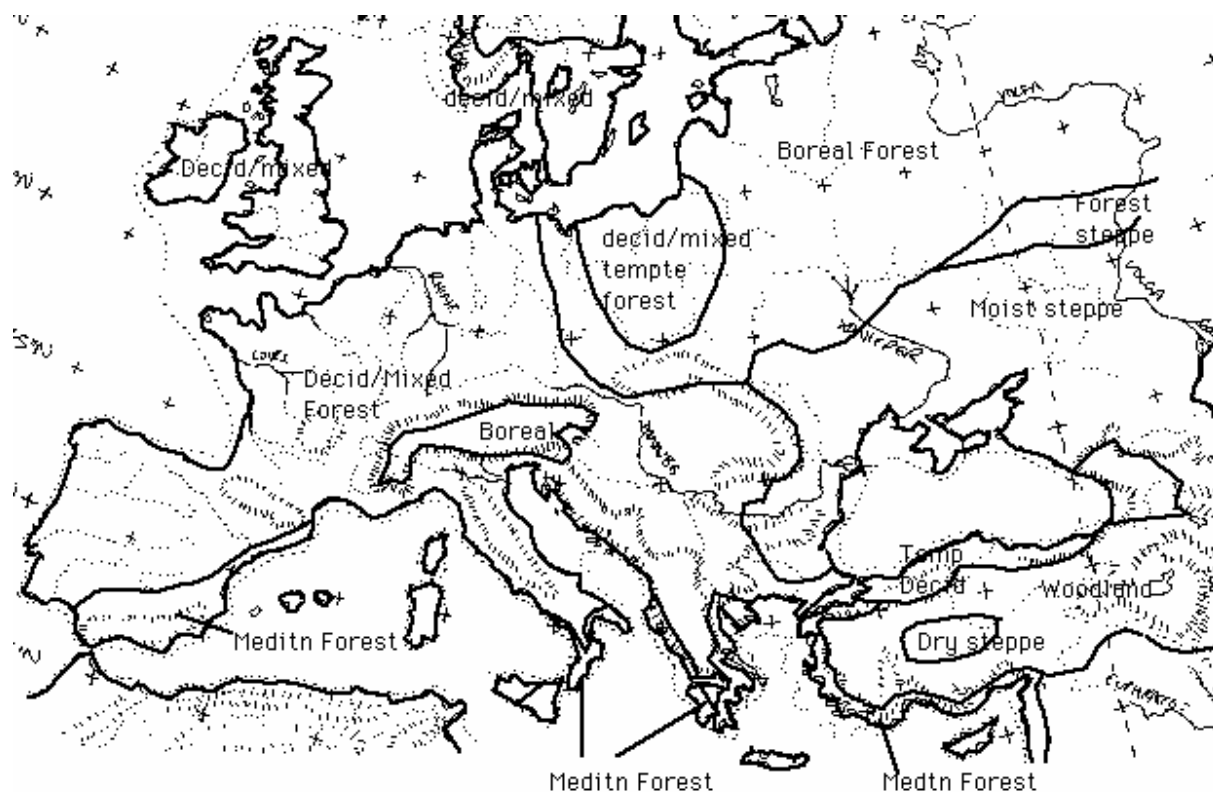
Předpokládaný vývoj evropské vegetace vytvořený na základě palynologických dat pro období posledního glaciálu (18 000 př. n.l.), období krátce před začátkem Dryasu (12 - 11 000 př. n. l.) a období mladšího Holocénu (8 - 9 000 př. n. l.) znázorňují Obr. č. 1 - 3 (Adams 1997).



Obr. č. 1. Mapa Evropy v období posledního glaciálního maxima 18 000 př. n .l. vytvořená na základě palynologických dat. Les tehdy existoval pouze v izolovaných horských oblastech na jihu evropských poloostrovů (Adams 1997). Převzato z <http://www.esd.ornl.gov/ern/qen/nerc.html>.



Obr. č. 2. Mapa Evropy v období před mladším Dryasem (12 - 11 000 př. n. l.) vytvořená na základě palynologických dat. Nastává ameliorace klimatu a expanze lesnaté vegetace (Adams 1997). Převzato z <http://www.esd.ornl.gov/ern/qen/nerc.html>.



Obr. č. 3. Mapa Evropy v období časného Holocénu (8 - 9 000 př. n. l.). Les je rozšířen ve většině Evropy, nicméně je více rozvolněný než v současnosti s množstvím bylinných pasek (Adams 1997). Převzato z <http://www.esd.ornl.gov/ern/qen/nerc.html>.

1.1.2.2. Genetická strukturovanost živočichů odpovídající subrefugiím

S výskytem temperátního lesa v období LGM nejspíše souviselo i rozšíření vlhkomilných organismů a organismů ekologicky vázaných na tento lesní ekosystém.

Příkladem takového organismu, který vykazuje strukturovanost populace v rámci Balkánu, může být druh *Apodemus flavicolis*. Tento druh přečkal glaciální zalednění ve třech blíže neurčených nezávislých subrefugiích, odkud následně expandoval severním směrem. (Michaux et al. 2005).

Poměrně časté je rozdělení na západní a východní linie, naznačující existenci minimálně dvou balkánských subrefugií, které korespondují geograficky s předpokládanými refugii temperátního lesa (a tudíž s dostatečným množstvím lokálních srážek). Nacházejí se přibližně v oblasti Dinárského pohoří a pohoří Pindos na západě a kolem pobřeží Černého moře na východě Balkánského poloostrova. Rozdělení na tyto západo-východní klady je

patrné např. u *Emys orbicularis* (Fritz et al. 2007), *Zamenis longissimus* (Musilová et al. 2010) a *Melanargia galathea* (Schmitt et al. 2006).

Také množství dalších organismů, zkoumaných pomocí molekulárních metod, vykazuje genetickou strukturovanost v rámci Balkánského poloostrova, jako příklady mohou sloužit druhy *Bombina variegata* (Fijarczyk et al. 2011), *Podarcis muralis* (Salvi et al. 2013), *Arion fuscus* (Pinceel et al. 2005), *Mesotriton alpestris* (Sotiropoulos et al. 2007).

Teorie „refugium-in-refugium“ je tedy podporována mnoha současnými molekulárně - genetickými studiemi zahrnujícími široké spektrum organismů. Otázkou zůstává, nakolik a v kterých konkrétních případech, je za tento trend je zodpovědný právě fragmentovaný výskyt lesa v tomto období, nakolik je primárně ovlivněn ekologickými faktory jako např. vyšším množstvím srážek a příznivějším mikroklimatem, které tento vznik lesa umožnilo, případně do jaké míry hrají roli historické (fylogeografické) faktory.

Protože typová lokalita druhu *E. concolor* leží ve městě Trabzon v severovýchodním Turecku, zůstal podle pravidel nomenklatury název *Erinaceus concolor* maloasijské linii a pro východoevropskou linii byl zvolen název *Erinaceus roumanicus*, vycházející z názvu poddruhu *Erinaceus concolor roumanicus*, který nesla tato evropská linie.

Erinaceus roumanicus je rozšířený od západní Sibiře přes Rusko, Ukrajinu, Bělorusko, severní Kavkaz a Balkánský poloostrov až do střední Evropy (IUCN Red List of Threatened species). Dále na západ je rozšířen druh *Erinaceus europaeus* a střední Evropou prochází sekundární kontaktní zóna, která je místem sympatrického výskytu obou druhů.



Obr. č. 5. Mapa rozšíření druhu *Erinaceus roumanicus* podle IUCN List of Threatened species. Převzato z <http://maps.iucnredlist.org/map.html?id=136344>.

1.2.2. Rekolonizace Evropy

Evropští ježci rodu *Erinaceus* tradičně slouží jako modelový příklad postglaciální rekolonizace Evropy. Tato kolonizace probíhala po skončení poslední doby ledové přibližně před 16 000 lety ze všech tří evropských poloostrovů, přičemž Pyrenejský a Apeninský poloostrov sloužili jako refugia druhu *E. europaeus*, zatímco Balkánský poloostrov druhu *E. roumanicus*. Následkem této rekolonizace je vznik zmiňované kontaktní zóny ve střední Evropě. Sommer (2007) na základě paleontologického záznamu předpokládá, že ke kontaktu obou druhů ve střední Evropě došlo v období Boreálu. Absenci mladších nálezů druhu *E. roumanicus* autor vykládá pouze jako artefakt nedostatečného fosilního záznamu. Na druhé straně srovnání genetické struktury obou druhů značí, že *E. roumanicus* se ve střední Evropě objevil později než *E. europaeus* a v této souvislosti byla vytvořena hypotéza o rozšíření druhu *E. roumanicus* v neolitickém období, kdy docházelo v důsledku činnosti člověka k plošnému odlesňování Evropy (Bolfíková & Hulva 2012).

Na základě podrobné genetické studie provedené na území České republiky, která leží ve středu kontaktní zóny a na jejímž území dochází k syntopickému výskytu obou druhů, lze konstatovat, že zde nedochází ke křížení či introgresi (Bolfíková & Hulva 2012). Naopak v ruské části kontaktní zóny je evidovaný výskyt hybridizace mezi oběma druhy. Bogdanov et al. (2009) na základě genotypování pěti jedinců chycených v okolí Moskvy detekovali jednoho zpětného křížence mezi F1 hybridem a druhem *E. roumanicus*. Tento fakt může být následkem pozdějšího vzniku ruské části kontaktní zóny a s tím souvisejícím dosud neúplným vytvořením prezygotických reprodukčně - izolačních bariér, které se v zóně střední Evropy pravděpodobně uplatňují jako separační mechanismus (Bolfíková & Hulva 2012).

Doba divergence mezi *E. roumanicus* a *E. europaeus* byla na základě analýzy DNA odhadnuta na 3,2 - 4,5 milionu let, což odpovídá období Pliocénu (Seddon et al. 2001), tento odhad se ovšem opět neshoduje se studií Bannikove et al. (2014), která na základě kombinace mitochondriálních a nukleárních genů odhaduje radiaci mezi druhy rodu *Erinaceus* (*E. concolor* + *E. roumanicus* a *E. europaeus* + *E. amurensis*) na dobu cca před 1 - 2,2 milionem let.

Velice podobný kolonizační scénář zjištěný u evropských ježků vykazují také evropský dub a jedle bělokorá (Hewitt 2000). Na základě této skutečnosti a vzhledem k předpokládané ekologické vazbě ježků na opadavý listnatý les byla vytvořena hypotéza, že ježci při této rekolonizaci severnějších částí Evropy doprovázeli vznik listnatého lesa (Seddon et al. 2001). Dále autoři předpokládají, že v balkánském refugiu ježci přežívali v malých,

navzájem izolovaných populací. Tato fragmentace byla důsledkem prostorové variability klimatu, jak naznačují palynologická data (Huntley 1999).

1.2.3. Ekologie druhu

1.2.3.1. Habitatová preference

E. roumanicus je popisován jako „původně stepní a lesostepní druh, který osidluje spíše teplejší a sušší místa v otevřené zemědělské krajině a vyhýbá se rozsáhlejším lesnatým oblastem“ (Anděra & Gaisler 2012). Tento popis druhu jako primárního obyvatele stepí, je však spíše celkovým zhodnocením areálu, jehož těžiště leží ve stepních oblastech. Navíc toto tvrzení je částečně v rozporu s výše zmíněnou teorií o následování vzniklého listnatého lesa při rekolonizaci Evropy (Seddon et al. 2001), které by tak odpovídalo pouze popisu *E. europaeus* jako primárního obyvatele lesů.

E. roumanicus v prostředí České republiky osidluje místa v nižších nadmořských výškách, převážně do 300 m.n.m, na mnoha místech se ovšem vyskytuje sympatricky s *E. europaeus*, např. v Praze (Bolfíková & Hulva 2012). Další detaily ohledně rozdílů v habitatové preferenci u obou evropských druhů ježků v zóně sympatrie nejsou známe, neboť „detailní vyhodnocení stanovištních nároků pro oblast ČR chybí“ (Anděra & Gaisler 2012). Výzkum habitatových preferencí byl zkoumán ve Velké Británii u druhu *E. europaeus*, kdy se tyto preference mění během noci i během ročního období podle typu momentálně dostupné potravy a zahrnuje různé typy habitatů, jako jsou stromy, zahrady, krátkostébelné a dlouhostébelné trávy a přechody mezi těmito mikrohabitaty (Reeve 1994).

Typ preferované potravy se liší také geograficky (např. srovnání mezi střední Evropou a Novým Zélandem) (Reeve 1994), s čímž může souviset i výběr odlišných mikrohabitátů v jiných než střeoevropských podmínkách.

1.2.3.2. Velikostní variabilita

S ekologií druhu souvisí i variabilita ve velikosti některých pevninských a ostrovních populací ježků. Tato variabilita ve velikosti mohla být (mimo jiné) důvodem popsání odlišných populací jako poddruhů *E. roumanicus*, které budou jmenovány níže.

Morfometrická studie (Kryštufek et al. 2009) odhalila rozdíly ve velikosti populací *E. roumanicus* v rámci Balkánu. Populace větší tělesné velikosti se vyskytovala na jihu, menší na severu balkánské pevniny. Tento velikostní gradient jde proti Bergmannovu pravidlu, které

tvrdí, že endotermní živočichové v chladnějších oblastech dosahují větší velikosti. Velikost byla nicméně pozitivně korelována s teplotou a negativně s množstvím letních srážek (jejichž vzestup v letním období vysvětloval nejvíce variability). Množství červencových srážek je podle autorů indikátorem sezonability mediteránního regionu, kdy jsou ježci vystaveni dvěma obdobím nedostatku potravy - suchému létu a chladné zimě. Protože ježci kolem jižního pobřeží Středozemního moře v zimě nehibernují, popř. hibernují jen několik dní (Schoenfeld & Yom - Tov 1985), jsou tak vystaveni větším fluktuacím zdrojů potravy (Kryštufek et al. 2009). Zvířata, která zůstávají aktivní celý rok, ale jsou vystaveni fluktuacím v dostupnosti zdrojů, jsou selektována k větší velikosti, protože čas, po který jsou schopni přežít bez jídla je s velikostí pozitivně korelován (Boyce 1978).

Variabilita ve velikosti u ostrovních populací ježků není dle studie Kryštufka et al. (2009) tolik ovlivněna sezónními oscilacemi zdrojů, o to důležitější roli zde hrají faktory jako je predace, kompetice či potravní interakce (Grant 1998). Optimalizovaná velikost těla u ostrovních populací malých savců v souvislosti s reprodukcí by měla být kolem 100g (van der Geer et al. 2010). Nicméně odpověď ostrovních populací ježků *Erinaceus roumanicus* na toto pravidlo není jednoznačná - velikost je negativně korelována se vzdáleností ostrova od pevniny (Kryštufek et al. 2009). Autoři tento jev vysvětlují lidmi způsobenou introdukcí velkých jedinců z pevniny na blízké ostrovy, tudíž tyto ostrovní populace nemají dostatek času reagovat ve shodě s ostrovními pravidly.

1.2.4. Popsané morfotypy Balkánu versus molekulárně určené linie

Vzhledem k rozsáhlému areálu výskytu druhu *E. roumanicus* zde existuje značná vnitrodruhová variabilita. Z tohoto důvodu bylo na základě morfologie popsáno množství poddruhů *E. roumanicus*, z nichž velký počet se vyskytuje na balkánském poloostrově. Druhový název níže vyjmenovaných poddruhů byl v době popsání jednotlivých poddruhů *europaeus*, popř. *concolor*, nikoliv *roumanicus*, ovšem z důvodů nedávné nomenklatorické změny jej zde uvádím jako *roumanicus*.

Mimo balkánskou oblast byly popsány melanická forma *Erinaceus roumanicus ponticus* Satunin, 1907 z východního pobřeží Černého moře a světlá forma *Erinaceus roumanicus pallidus* Stroganov, 1957 ze západní Sibiře (Corbet 1988). Dále dva poddruhy vyskytující se v Turecku a na okolních ostrovech, dříve považované za příslušníky druhu *E. roumanicus*, *Erinaceus concolor transcausicus* Satunin, 1905 a *Erinaceus concolor rhodius* Festa, 1914, patří maloasijskému druhu *Erinaceus concolor*. Ve střední Evropě se vyskytuje

poddruh *Erinaceus roumanicus roumanicus* Barrett-Hamilton, 1900 (Kratochvíl 1980). Kromě tohoto středoevropského poddruhu byl na základě morfologie krania popsán odlišný typ, vyznačující se prodlouženou lebkou a menší kapacitou mozkovny, vyskytující se v oblasti Rumunska a Bulharska (Holz 1978). Tento morfotyp byl popsán Kratochvílem (1980) jako příslušník poddruhu *Erinaceus roumanicus drozdovskii* Martino, 1933. Dalším popsáním poddruhem balkánského poloostrova je *Erinaceus roumanicus bolkayi* Martino, 1930, který se podle autorů Đulić & Mirić (1967) vyskytuje v oblasti Slovinska, Chorvatska, Bosny a Hercegoviny a Černé Hory. Posledním podruhem je *Erinaceus roumanicus danubicus* Matschie, 1901, popsáný z oblasti Rumunska.

Giagia & Markakis (1996) pomocí morfometrie krania analyzovali 191 řeckých a ostrovních jedinců a dále jedince z Bulharska a bývalé Jugoslávie. Studie ukázala, že se v Bulharsku nachází pouze dva poddruhy - menší *E.r. roumanicus* a jeden větší poddruh, zahrnující oba *E.r. bolkayi* a *E.r. drozdovskii*, přestože byly dříve popsány jako odlišné formy, nejspíše v důsledku záměny jmen obou poddruhů, ke které zřejmě došlo při jejich popisu. V pevninském Řecku je rozšířen větší poddruh, a ačkoliv jsou populace původem z Bulharska a Řecka navzájem odlišné, jsou charakteristické morfometrickou kontinuitou. Na jihu Balkánského poloostrova je tedy rozšířen pouze větší poddruh *E.r. bolkayi* (Giagia & Markakis 1996), což souhlasí s výsledky studie Kryštufka et al. (2009), s tím rozdílem, že autoři přikládají tuto velikostní variabilitu sezonabilitě prostředí. Distribuce poddruhů *Erinaceus roumanicus* v Řecku a na okolních ostrovech podle Giagia & Markakis (1996) je zobrazena na Obr. č. 6.

Poddruh *E.r. nesiotus* Bate, 1906, který je rozšířený na Krétě, Kykládách a několika ostrovech v Iónském moři, je podle morfologické studie Giagia & Markakis (1996) signifikantně odlišný od pevninské formy.

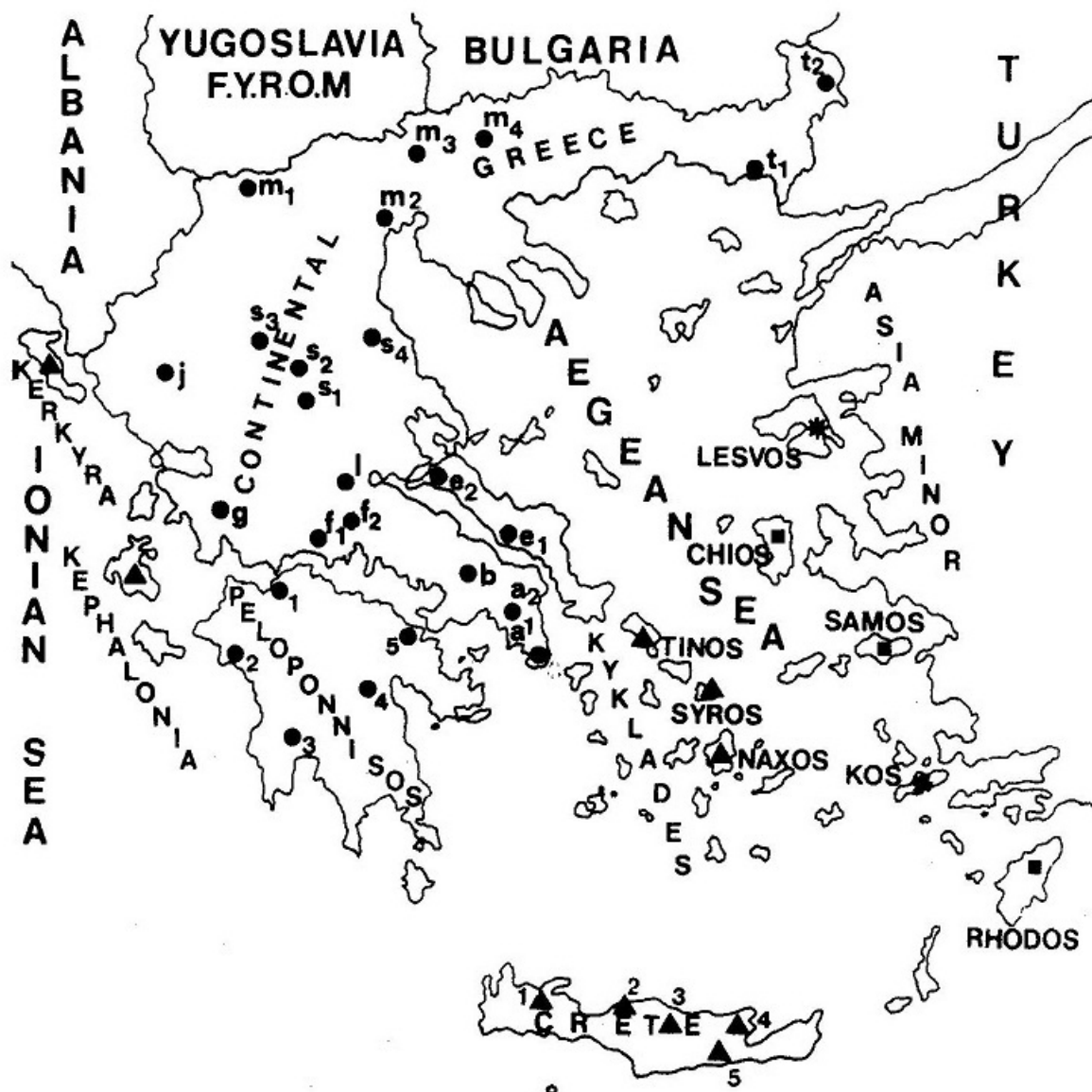
Všechny uvedené balkánské poddruhy sdílejí identický karyotyp, s výjimkou *rhodius* a *transcaucasicus* (Giagia & Ondrias 1980), které jsou nyní považovány za příslušníky druhu *E. concolor*.

Z výše nastíněné situace je zřejmé, že ačkoliv se problematice taxonomie druhu *E. roumanicus* detailně věnovalo množství lidí, situace je velmi nepřehledná, navíc si jednotlivé názory často protirečí. Je tedy nutné konstatovat, že chybí celková taxonomická revize, která by zahrnovala morfologickou a genetickou analýzu vzorků z typových lokalit popsáných poddruhů, na jejímž základě by bylo možné vyvodit závěry. Popsané poddruhy *E. roumanicus* jsou shrnuté v Tab. č. 1.

Na základě mitochondriální DNA byly určeny tři nehluboce větvené linie - první zahrnuje vzorky původem z Řecka a evropské části Turecka, druhá spojuje vzorky z Ruska, Rakouska a Maďarska a třetí vzorky z evropské části Balkánu, Ukrajiny a Ruska (Seddon et al. 2002). Jiná práce také ukazuje na několik linií - první tvoří evropská část Turecka a Kréta, druhou a třetí geograficky blíže neurčené linie z pevninské části Balkánu (Seddon et al. 2001).

název poddruhu	typová lokalita	publikace
<i>Erinaceus (roumanicus) ponticus</i> Satunin, 1907	Gruzie	Corbet 1988
<i>Erinaceus roumanicus pallidus</i> Stroganov, 1957	Tobolsk, Sibiř	Corbet 1988
<i>Erinaceus roumanicus transcaucasicus</i> Satunin, 1905	Nakhichevan, Irán	Corbet 1988
<i>Erinaceus (roumanicus) danubicus</i> Matschie, 1901	Rumunsko	Corbet 1988
<i>Erinaceus roumanicus roumanicus</i> Barrett-Hamilton, 1900	Gageni, Rumunsko	Niethammer & Krapp 1990
<i>Erinaceus roumanicus rhodius</i> Festa, 1914	Koskino, Rhodos	Niethammer & Krapp 1990
<i>Erinaceus roumanicus bolkayi</i> Martino, 1930	Cetinje, Černá Hora	Niethammer & Krapp 1990
<i>Erinaceus roumanicus drozdovskii</i> Martino 1933	Kozani, Makedonie	Niethammer & Krapp 1990
<i>Erinaceus roumanicus nesiotes</i> Bate, 1906	Gonia, Kréta	Niethammer & Krapp 1990

Tab. č. 1. Popsané poddruhy *E. roumanicus*, včetně typové lokality a citované práce. Závorky značí, že byl poddruh původně popsán jako samostatný druh.



Obr. č. 6. Distribuce jednotlivých poddruhů *Erinaceus roumanicus* v Řecku a na okolních ostrovech. ● = *E. r. bolkayi*, ▲ = *E. r. nesiotes*, ■ = *E. c. rhodius*, * = *E. c. transcaucasicus*
 Kontinentální Řecko: a = Attica (a1 = Koropi, a2 = Parnitha), b = Biotia (Thebes), e = Evoia (e1 = Aliveri, e2 = Edipsos), l = Fthiotida (Lamia), f = Fokida (f1 = Lidoriki, f2 = Tichio), g = Aetoloakarnania (Agrinio), i = Epiros (Ioannina), s = Thessalia (s1 = Karditsa, s2 = Trikala, s3 = Kalambaka, s4 = Elassona), m = Makedonie (m1 = Florina, m2 = Alexandria, m3 = Kilkis, m4 = Serrae), t = Thrace (t1 = Alexandroupolis, t2 = Soufli).
 Peloponés: 1 = Kastritsi (Patra), 2 = Pyrgos, 3 = Kiparissia, 4 = Astros (Kinouria), 5 = Korinthos
 Kréta: 1 = Chania, 2 = Rethymno, 3 = Iraklio, 4 = Agios Nikolaos, 5 = Ierapetra

1.2.5. Paleontologický záznam druhu

Druh *Erinaceus roumanicus* je paleontologicky doložen z 52 míst v Evropě. Nicméně je potřeba připomenout, že fosilní exempláře jsou často neúplné a v oblastech sympatrického výskytu s *E. europaeus* může být problém s diskriminací obou druhů. V publikovaných pracích je determinace fosilních exemplářů často prováděna *a posteriori* na základě současné distribuce (Sommer 2007).

Záznam z období Pleistocénu je velmi vzácný a pochází převážně z jeskyní v Řecku, nicméně je důkazem, že druh přežíval poslední ledovou dobu na balkánském poloostrově. Dále existují dva zpochybňované pleistocénní nálezy ze dvou jeskyní v Polsku (Sommer 2007).

V období Holocénu je fosilní záznam neméně vzácný. Nálezy z časného Holocénu jsou doloženy pouze ze dvou řeckých jeskyní (Sommer 2007). V oblasti dnešního západního limitu rozšíření se *Erinaceus roumanicus* objevil v záznamu v pozdním Atlantiku a předpokládá se, že většinu dnes obývaného západního území dosáhl již v Boreálu, kdy také došlo ke kontaktu s druhem *E. europaeus*. Od tohoto setkání se hranice areálu rozšíření obou druhů zdají být přibližně konstantní (Sommer 2007).

Nejstarší paleontologický záznam druhu *Erinaceus roumanicus* na Krétě (popsaného zde jako poddruh *E.r. nesiotis* (Bate 1906)) sahá do raně mínojské doby (cca 3000 - 2200 př. n .l.) (Jarman 1996). Konkrétní nález pochází z hrobky Krasí Pediados, je ovšem možné, že nalezená zvířata spadla do hrobky o něco později a nejsou nutně stejného stáří. Nicméně další obdobně datované záznamy pocházejí z archeologického naleziště Phaistos. Lze tedy předpokládat, že druh je součástí krétské fauny od mínojského období, ačkoliv nelze jednoznačně odpovědět na otázku, jaký byl důvod tohoto importu (Jarman 1996). Kupříkladu etnozoologické výzkumy naznačují, že ježci byli od prehistorických dob využíváni jako ochrana proti hadům (Masetti & Sará 2003).

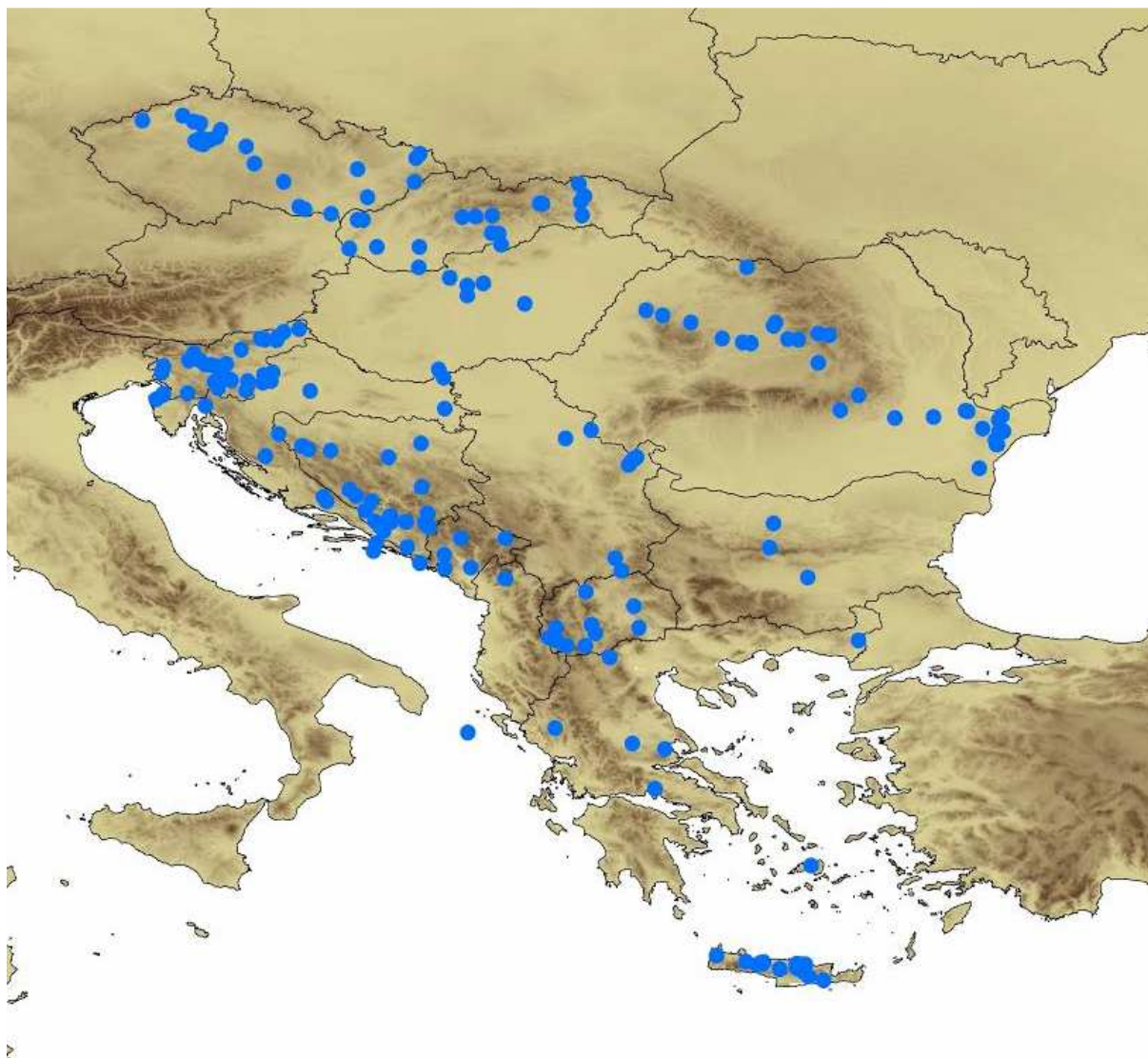
2. Materiál a metody

2.1. Vzorky

Převážná část materiálu pochází z jedinců uhynulých na silnicích v oblasti západopalearktického výskytu ježka východního (*Erinaceus roumanicus*). Podstatná část vzorků byla získána ve spolupráci s Natural History Museum of Crete, Borisem Kryštufkem a Sándorem Attilou. Celkem bylo získáno 288 vzorků z množství evropských států, zahrnující od severozápadu po jihovýchod tyto: Česká republika, Slovenská republika, Maďarsko, Rumunsko, Slovinsko, Chorvatsko, Bosna a Hercegovina, Černá Hora, Srbsko, Bulharsko, Makedonie, Řecko. Dále kromě těchto množství vzorků pocházelo z Kréty a dalších ostrovů (Rhodos, Kós).

Přesné lokality, GPS souřadnice, seznam nálezců a datum sběru je uvedeno v Tab. č. 2. K jednotlivým vzorkům byla podle známých GPS souřadnic, popř. popisu místa nálezu, vytvořena s využitím Geografického informačního systému (GIS) mapa, zaznamenávající jejich geografický původ (Obr. č. 7.).

Tkáň byla fixována v 96% ethanolu a skladována při teplotě - 20 ° C.



Obr. č. 7. Mapa znázorňující geografický původ získaných vzorků, vytvořená pomocí GIS.

označení	země původu	lokalita	datum odběru	GPS souřadnice		sběr
BH1	Bosnia and Herzegovina	Nevesinje - Gacko	NA	43.26	18.11	Kryštufek Boris
BH10	Bosnia and Herzegovina	Tjentište, Predeo	NA	43.23	18.46	Kryštufek Boris
BH11	Bosnia and Herzegovina	Bosanski Petrovac	2008	44.55	16.37	Kryštufek Boris
BH13	Bosnia and Herzegovina	Tomislavgrad	2008	43.72	17.22	Kryštufek Boris
BH14	Bosnia and Herzegovina	Livno	2008	43.83	17.01	Kryštufek Boris
BH15	Bosnia and Herzegovina	Bihač	NA	44.83	15.84	Kryštufek Boris
BH16	Bosnia and Herzegovina	Bračanac, 540 m	5.10.2007	43.46	17.39	Kryštufek Boris
BH17	Bosnia and Herzegovina	Nevesinje - Gacko	6.10.2007	43.17	18.53	Kryštufek Boris
BH18	Bosnia and Herzegovina	Mostar, Vrapičići	7.6.2007	43.37	17.84	Kryštufek Boris
BH19	Bosnia and Herzegovina	Trebinje, Žakovo	27.3.2007	42.81	18.14	Kryštufek Boris
BH2	Bosnia and Herzegovina	Mostar	NA	43.34	17.81	Kryštufek Boris
BH20	Bosnia and Herzegovina	Buna	27.4.2011	43.25	17.84	Toni Koren
BH21	Bosnia and Herzegovina	Bileća-Gacko	4.8.2007	43.16	18.54	Kryštufek Boris
BH22	Bosnia and Herzegovina	Nevesinja	5.8.2007	43.26	18.12	Kryštufek Boris
BH23	Bosnia and Herzegovina	Buško jezero, 720 m	7.8.2007	43.63	17.05	Kryštufek Boris
BH24	Bosnia and Herzegovina	Nevesinje	2.9.2010	43.26	18.12	Gvoždík Václav
BH25	Bosnia and Herzegovina	Husino	6.9.2010	44.66	18.39	Gvoždík Václav
BH3	Bosnia and Herzegovina	Gacko	NA	43.17	18.54	Kryštufek Boris
BH4	Bosnia and Herzegovina	Libno	12.9.2008	43.27	17.56	Kryštufek Boris
BH5	Bosnia and Herzegovina	Bosanski Petrovac	3.9.2008	44.61	16.25	Kryštufek Boris
BH6	Bosnia and Herzegovina	Ključ, Pudlin Han	3.9.2008	44.53	16.77	Kryštufek Boris
BH7	Bosnia and Herzegovina	Mrkonjić Grad	3.9.2008	44.42	17.08	Kryštufek Boris
BH8	Bosnia and Herzegovina	Sarajevo	6.10.2007	43.88	18.40	Kryštufek Boris
BH9	Bosnia and Herzegovina	Goražde	NA	43.41	18.51	Kryštufek Boris
BLG1	Bulgaria	Troyan, Stara planina	9.5.2009	42.80	24.63	Kryštufek Boris
BLG3	Bulgaria	Loveč	10.5.2009	43.23	24.70	Kryštufek Boris
BLG4	Bulgaria	Spasovo	2011	42.26	25.32	Kryštufek Boris
CR1	Croatia	Trilj, Košute	12.5.2007	43.63	16.70	Kryštufek Boris

CR11	Croatia	Milići	29.4.2011	45.60	16.04	Toni Koren
CR13	Croatia	Plovanija	3.6.2011	45.45	13.64	Koren Toni
CR14	Croatia	Draž	19.6.2011	45.84	18.79	Koren Toni
CR15	Croatia	Mljet	28.7.2005	42.74	17.54	Kryštufek Boris
CR16	Croatia	Mljet	28.7.2005	42.74	17.54	Kryštufek Boris
CR17	Croatia	Mljet	28.7.2005	42.74	17.54	Kryštufek Boris
CR18	Croatia	Dubrovnik	30.7.2007	42.67	18.08	Kryštufek Boris
CR19	Croatia	Vinkovci	18.9.2011	45.29	18.81	Toni Koren
CR2	Croatia	Trilj, Košute	13.5.2007	43.63	16.70	Kryštufek Boris
CR20	Croatia	Gruda	3.5.2012	42.52	18.37	Kryštufek Boris
CR21	Croatia	Gruda	4.5.2012	42.52	18.37	Kryštufek Boris
CR3	Croatia	Sinj, Dicmo	12.5.2007	43.70	16.64	Kryštufek Boris
CR4	Croatia	Debeli brijeg	15.6.2007	42.87	17.59	Kryštufek Boris
CR5	Croatia	Ozeljan, 172 m	15.6.2007	45.93	13.74	Kryštufek Boris
CR6	Croatia	Ozeljan, 172 m	15.6.2007	45.93	13.74	Kryštufek Boris
CR7	Croatia	Pag	24.7.1987	44.44	15.06	Kryštufek Boris
CR8	Croatia	Mala Neretva	28.4.2011	43.18	17.65	Toni Koren
CR9	Croatia	Klepci	28.4.2011	43.09	17.72	Toni Koren
GR19	Greece	Florina	25.4.2011	40.83	21.77	Šťáhlavský František, Hynková Ivana
GR20	Greece	Korfu, Ano Mesogi	19.4.2011	39.48	19.23	Šťáhlavský František, Peprný Miroslav
GR54	Greece	Kykladon, Naxos, Kalandos Bay	10.3.2001	35.36	24.48	Kryštufek Boris
GR79	Greece	Soufliou, Dadia	29.7.2006	35.33	24.50	Kryštufek Boris
GR80	Greece	Evrou, Soufliou, Dadia	29.7.2006	35.32	24.41	Kryštufek Boris
GR86	Greece	Magnisias, Volou, Melissiatika	20.4.2009	35.33	25.11	Kryštufek Boris
GR87	Greece	Voiotias, Levadeias, Arachova	NA	35.27	25.18	Kryštufek Boris
GR89	Greece	Farsalon, Farsala to Karditsa	5.4.2010	35.37	24.53	Kryštufek Boris
GR90	Greece	Ioanninon, Dodonis, Kaloupaki	24.6.2010	35.33	25.28	Kryštufek Boris
GR34	Crete	Rethymno, Akournia	9.5.2010	35.49	23.69	NHMC Crete
GR35	Crete	Rethymno, Melabes	9.5.2010	35.25	24.81	NHMC Crete

GR37	Crete	Retliymno, Agios Andreas	14.5.2010	35.30	25.16	NHMC Crete
GR42	Crete	Rethymnou, Myloi	30.7.1996	37.10	25.38	NHMC Crete
GR43	Crete	Temenous, Patsides	12.7.1999	35.49	23.69	NHMC Crete
GR47	Crete	Lasithiou, Lasithi plateau, Moni Vidiani	2.11.2000	35.38	24.21	NHMC Crete
GR48	Crete	Irakleiou, Pediadadas, Gournes	7.11.2000	35.34	25.14	NHMC Crete
GR50	Crete	Chanion, Kissamou, Kaloudiana	1.12.2000	35.25	25.14	NHMC Crete
GR51	Crete	Crete	1.2.1997	35.30	25.16	NHMC Crete
GR52	Crete	Irakleiou, Temenous, Knossos	10.1.2001	35.05	25.06	NHMC Crete
GR56	Crete	Chanion, Kissamou, Kaloudiana	1.2.2001	35.24	24.81	NHMC Crete
GR62	Crete	Chanion, Apokoronos, Chania, Itzedin jail	11.1.2003	35.19	25.25	NHMC Crete
GR66	Crete	Irakleiou, Temenous, Irakleio, Knossou	26.7.2003	35.27	25.11	NHMC Crete
GR67	Crete	Irakleiou, Temenous, Giouchtas mt.	19.11.2003	41.13	26.23	NHMC Crete
GR68	Crete	Irakleiou, Temenous, Knossou evenue	14.8.2004	41.13	26.23	NHMC Crete
GR69	Crete	Irakleiou, Monofatsio, Loures	5.12.2004	35.19	25.25	NHMC Crete
GR74	Crete	Crete	NA	35.33	25.26	NHMC Crete
GR77	Crete	Irakleiou, Pediadas, Voni	11.9.2006	35.12	25.34	NHMC Crete
GR78	Crete	Irakleiou, Temenous, Malades, Semeli hill	23.11.2006	39.19	22.76	NHMC Crete
GR81	Crete	Irakleiou, Pediadas, Voni	6.9.2007	38.48	22.58	NHMC Crete
GR82	Crete	Irakleiou, Pedidas, Kokkini Chani	11.12.2007	35.34	25.12	NHMC Crete
GR83	Crete	Irakleiou, Pediadas, Panagia	22.3.2008	39.29	22.17	NHMC Crete
GR88	Crete	Irakleiou, Temenous, Irakleio, Martyron	29.10.2009	39.56	20.79	NHMC Crete
GR94	Crete	Irakleiou, Temenous, Irakleio	10.12.2010	35.31	25.15	NHMC Crete
M10	Hungary	Budapešť	NA	47.49	19.22	Krisztina Rigó
M11	Hungary	Pécs, Pecsbagota	NA	45.99	18.07	Kryštufek Boris
M12	Hungary	Szolnok, Alcsi	2010	47.16	20.25	Kryštufek Boris
M4	Hungary	Hungary	NA	47.31	19.22	Schneiderová Irena
M5	Hungary	Pilisvörösvár	NA	47.63	18.90	Krisztina Rigó
M6	Hungary	Budapešť	NA	47.49	19.22	Krisztina Rigó
M7	Hungary	Margater island	NA	47.53	19.05	Krisztina Rigó

M8	Hungary	Margater island	NA	47.53	19.05	Krisztina Rigó
M9	Hungary	Pilisvörösvár	NA	47.63	18.90	Krisztina Rigó
MC1	Macedony	Ohrid	NA	41.13	20.82	Kryštofek Boris
MC10	Macedony	Struga	NA	41.18	20.68	Kryštofek Boris
MC11	Macedony	Pletvar	NA	41.26	21.51	Kryštofek Boris
MC12	Macedony	Radoviš	NA	41.36	22.29	Kryštofek Boris
MC14	Macedony	Ohrid	6.9.2007	41.13	20.81	Kryštofek Boris
MC16	Macedony	road M4 near Arbinovo	25.4.2011	41.36	20.81	Šťáhlavský František, Hynková Ivana
MC18	Macedony	Skopje	2011	42.00	21.34	Bolfíková Barbora
MC4	Macedony	Bitola	NA	41.04	21.33	Kryštofek Boris
MC5	Macedony	Štip	13.10.2009	41.75	22.20	Kryštofek Boris
MC6	Macedony	Resen - Carev Dvor	9.8.2008	41.04	21.00	Kryštofek Boris
MC7	Macedony	Bitola	14.8.2008	41.04	21.33	Kryštofek Boris
MC8	Macedony	Prilep - Ropotovo	14.8.2008	41.41	21.44	Kryštofek Boris
MC9	Macedony	Prilep - Ropotovo	14.8.2008	41.41	21.44	Kryštofek Boris
MN1	Monte Negro	Virpazar	NA	42.24	19.09	Kryštofek Boris
MN2	Monte Negro	Crnotevica	NA	42.44	19.28	Kryštofek Boris
MN3	Monte Negro	Šavnik	NA	42.96	19.09	Kryštofek Boris
MN4	Monte Negro	Šavnik, 855 m	10.6.2007	42.96	19.10	Kryštofek Boris
MN5	Monte Negro	Virpazar, 233 m	10.6.2007	42.24	19.09	Kryštofek Boris
MN6	Monte Negro	Njeguši, 910 m	3.8.2007	42.43	18.81	Kryštofek Boris
RMN10	Romania	Mihai Viteazu	25.4.2012	44.64	28.70	Sándor Attila
RMN11	Romania	Poarta Alba	14.4.2011	44.22	28.39	Sándor Attila
RMN12	Romania	Lăstun	16.6.2011	45.08	28.74	Sándor Attila
RMN13	Romania	Măcin	15.5.2011	45.24	28.18	Sándor Attila
RMN14	Romania	Romania	NA	45.25	28.14	Kryštofek Boris
RMN15	Romania	Mănăstirea Cerbu	21.10.2011	44.93	28.45	Sándor Attila
RMN16	Romania	Baia	21.10.2011	44.72	28.68	Sándor Attila
RMN17	Romania	Tulcea	16.6.2011	45.16	28.79	Sándor Attila

RMN18	Romania	Dumbrava, Com Capus, Gradina	29.9.2010	46.83	23.22	Sándor Attila
RMN19	Romania	Tulcea	13.5.2012	45.16	28.80	Sándor Attila
RMN20	Romania	Baraj Siriu	29.4.2012	45.52	26.23	Sándor Attila
RMN21	Romania	Sinoe	25.4.2012	44.64	28.72	Sándor Attila
RMN23	Romania	Enisala	27.4.2012	44.88	28.83	Sándor Attila
RMN24	Romania	Bunești	06.7.2012	46.11	25.05	Sándor Attila
RMN25	Romania	Chețani	28.4.2011	46.46	24.03	Sándor Attila
RMN26	Romania	Visterna	27.4.2012	44.88	28.75	Sándor Attila
RMN29	Romania	Petrova	05.5.2011	47.82	24.23	Sándor Attila
RMN33	Romania	Sovata	08.6.2011	46.63	25.05	Sándor Attila
RMN34	Romania	Ocna de Sus	19.5.2011	46.52	25.15	Sándor Attila
RMN36	Romania	Sovata	06.5.2011	46.60	25.07	Sándor Attila
RMN37	Romania	Ugra	06.8.2011	46.45	24.30	Kryštofek Boris
RMN38	Romania	Turda	22.4.2012	46.54	23.78	Sándor Attila
RMN39	Romania	Aleșd	01.5.2011	47.05	22.42	Sándor Attila
RMN4	Romania	Oprisenesti	22.4.2012	45.14	27.57	Sándor Attila
RMN41	Romania	Chibed	02.7.2012	46.53	24.96	Sándor Attila
RMN42	Romania	Văleni	02.7.2012	46.83	24.74	Sándor Attila
RMN45	Romania	Garvan	22.4.2012	45.26	28.09	Sándor Attila
RMN48	Romania	Negreni	NA	46.96	22.72	Ghira
RMN6	Romania	Buzau	22.4.2012	45.12	26.88	Sándor Attila
RMN8	Romania	Cuci	28.4.2011	46.47	24.15	Sándor Attila
RMN9	Romania	Reghin	28.5.2011	46.77	24.70	Sándor Attila
SL1	Slovenia	Kampel	NA	47.82	18.35	Kryštofek Boris
SL10	Slovenia	Muljava, Gabrovčec	5.6.2011	48.18	17.06	Kryštofek Boris
SL11	Slovenia	Zalog	14.4.2007	48.95	20.56	Kryštofek Boris
SL12	Slovenia	Dvor-Soteska	27.4.2007	48.95	20.56	Kryštofek Boris
SL13	Slovenia	Žumberk	26.8.2007	48.95	20.56	Kryštofek Boris
SL15	Slovenia	Marinča vas	23.6.2007	48.95	20.56	Kryštofek Boris

SL16	Slovenia	Fužine, 256 m	23.6.2007	45.52	13.75	Kryštufek Boris
SL17	Slovenia	Sobota, Sebeborci	25.6.2007	45.90	14.80	Kryštufek Boris
SL19	Slovenia	Bertoki	6.4.2011	46.07	14.61	Toni Koren
SL20	Slovenia	Gornja Radgona, Plitvički vrh	2011	45.79	14.99	Kryštufek Boris
SL22	Slovenia	Žužemberk, Dvor	4.6.2009	45.75	15.55	Kryštufek Boris
SL23	Slovenia	Bela Krajina, Jugorje	28.9.2009	45.87	14.82	Kryštufek Boris
SL24	Slovenia	Bela Krajina, Gradac	28.9.2009	46.09	14.09	Kryštufek Boris
SL25	Slovenia	Zbilje	20.9.2009	46.71	16.20	Kryštufek Boris
SL26	Slovenia	Krška vas	26.9.2009	42.81	18.14	Kryštufek Boris
SL27	Slovenia	Maribor - Slemen	11.8.2007	46.66	15.93	Kryštufek Boris
SL28	Slovenia	Slovenj Gradec, 430m	11.8.2007	45.81	14.97	Kryštufek Boris
SL29	Slovenia	Pirešica, 325m	11.8.2007	45.78	15.28	Kryštufek Boris
SL3	Slovenia	Straža	3.10.2009	45.61	15.25	Kryštufek Boris
SL30	Slovenia	Janče	12.8.2007	46.16	14.42	Kryštufek Boris
SL31	Slovenia	Žlebič, 510 m	14.8.2007	45.89	15.57	Kryštufek Boris
SL32	Slovenia	Grčarice, 520 m	14.8.2007	46.52	15.59	Kryštufek Boris
SL33	Slovenia	Pobogi	16.7.2011	46.51	15.08	Tjaša Zagoršek
SL35	Slovenia	Prade	8.7.2011	46.34	15.17	Tjaša Zagoršek
SL36	Slovenia	Čežarji	16.7.2011	45.78	15.07	Tjaša Zagoršek
SL37	Slovenia	Bertoki	25.7.2011	46.05	14.71	Tjaša Zagoršek
SL38	Slovenia	Prade	9.7.2011	45.77	14.69	Tjaša Zagoršek
SL39	Slovenia	Škocjan	15.7.2011	45.65	14.75	Tjaša Zagoršek
SL4	Slovenia	Maribor - Ruše	30.8.2008	45.94	15.73	Kryštufek Boris
SL40	Slovenia	Ljubljana - Borovnica, Breg	2011	45.54	13.77	Kryštufek Boris
SL41	Slovenia	Ljubljana - Borovnica, Breg	2011	46.05	14.11	Kryštufek Boris
SL42	Slovenia	Stalcejri	1.9.2012	45.55	13.77	Štáhlavský František, Plíšková Jana
SL43	Slovenia	Britof	8.9.2012	45.54	13.77	Štáhlavský František, Plíšková Jana
SL44	Slovenia	Slovenia	4.7.1905	45.54	13.77	Hulva Pavel
SL45	Slovenia	Slovenia	4.7.1905	46.54	15.51	Hulva Pavel

SL5	Slovenia	Žužemberk, Mariča vas	14.9.2008	45.56	14.21	Kryštufek Boris
SL7	Slovenia	Kranj, Naklo	10.4.09	45.56	14.21	Kryštufek Boris
SL8	Slovenia	Lenart v Slov. Goricah	7.6.2009	45.34	14.52	Kryštufek Boris
SR1	Serbia	Vranje	5.5.2009	46.15	14.23	Kryštufek Boris
SR2	Serbia	Vranje	5.5.2009	46.08	14.52	Kryštufek Boris
SR3	Serbia	Đerdap	NA	46.08	14.52	Kryštufek Boris
SR4	Serbia	Đerdap	NA	45.87	14.82	Kryštufek Boris
SR5	Serbia	Đerdap	NA	46.27	14.32	Kryštufek Boris
SR6	Serbia	Đerdap	NA	46.58	15.83	Kryštufek Boris
SR7	Serbia	Đerdap	NA	42.38	21.98	Kryštufek Boris
SR8	Serbia	Đerdap	NA	42.61	21.87	Kryštufek Boris
VOJ1	Serbia-Vojvodina	Bela Crkva	6.9.2009	44.28	22.10	Kryštufek Boris
VOJ2	Serbia-Vojvodina	Kovin, Majur bara	2011	44.34	22.15	Kryštufek Boris
1	Czech republic	Praha-Krč	26.4.2007	50.03	14.43	Bolfíková Barbora, Hulva Pavel, Kaftan Milan
5	Czech republic	Libenice	26.4.2007	49.98	15.25	Bolfíková Barbora, Hulva Pavel, Kaftan Milan
7	Czech republic	Praha-Břevnov	29.4.2007	50.08	14.35	Bolfíková Barbora, Hulva Pavel
8	Czech republic	Předonín U Štětí	6.5.2007	50.43	14.32	Lučan Radek
9	Czech republic	Předonín U Štětí	6.5.2007	50.43	14.32	Lučan Radek
10	Czech republic	Zlonice U Slaného	6.5.2007	50.28	14.08	Lučan Radek
14	Czech republic	Lednice	30.5.2007	48.78	16.78	Bolfíková Barbora, Hulva Pavel
16	Czech republic	Praha-Kajetánka	2.6.2007	50.08	14.35	Bolfíková Barbora
17	Czech republic	Praha-Stromovka	1.6.2007	50.10	14.42	Gvoždík Václav
18	Czech republic	Liběchov	22.5.2007	50.40	14.43	Gvoždík Václav
21	Czech republic	Praha-Kajetánka	7.6.2007	50.08	14.35	Bolfíková Barbora, Hulva Pavel
22	Czech republic	Praha-Kajetánka	7.6.2008	50.08	14.35	Bolfíková Barbora, Hulva Pavel
24	Czech republic	Praha-Jižní Město	7.7.2007	50.02	14.48	Bolfíková Barbora, Schneiderová Irena
25	Czech republic	Praha-Jižní Město	7.7.2007	50.02	14.48	Bolfíková Barbora, Schneiderová Irena
26	Czech republic	Praha-Jižní Město	7.7.2007	50.02	14.48	Bolfíková Barbora, Schneiderová Irena
27	Czech republic	Praha-Jižní Město	7.7.2007	50.02	14.48	Bolfíková Barbora, Schneiderová Irena

28	Czech republic	Praha-Jižní Město	7.7.2007	50.02	14.48	Bolfíková Barbora, Schneiderová Irena
29	Czech republic	Praha-Jižní Město	7.7.2007	50.02	14.48	Bolfíková Barbora, Schneiderová Irena
32	Czech republic	Velké Karlovice	17.6.2007	49.35	18.27	Šobotník Jan
43	Czech republic	Horní Počernice	17.7.2007	50.10	14.60	Gvoždík Václav
44	Czech republic	Horní Počernice	30.8.2007	50.10	14.60	Gvoždík Václav
47	Czech republic	Praha-Trója	2.9.2007	50.12	14.42	Bolfíková Barbora
58	Czech republic	Praha-Prosek	17.11.2007	50.12	14.48	Gvoždík Václav
59	Czech republic	Praha-Prosek	17.10.2007	50.12	14.48	Gvoždík Václav
84	Czech republic	Praha 9	7.4.2008	50.12	14.48	Dvorská Zdena
85	Czech republic	Praha 4	7.4.2008	50.03	14.43	Dvorská Zdena
96	Czech republic	Znojmo	2.5.2008	48.85	16.03	Reiter Antonín
98	Czech republic	Vítonice	6.6.2008	48.90	16.20	Reiter Antonín
101	Czech republic	Čelákovice	17.5.2008	50.15	14.73	Hulva Pavel
111	Czech republic	Praha-Bohnice	2.6.2008	50.12	14.42	Pithartová Tereza
112	Czech republic	Praha-Staré Bohnice	31.5.2008	50.12	14.42	Pithartová Tereza
113	Czech republic	Praha-Bohnice	25.6.2008	50.12	14.42	Pithartová Tereza
116	Czech republic	Praha-Trója	18.6.2008	50.12	14.42	Pithartová Tereza
117	Czech republic	Praha-Trója	10.7.2008	50.12	14.42	Pithartová Tereza
121	Czech republic	Čelákovice	31.5.2008	50.15	14.73	Pithartová Tereza
123	Czech republic	Praha-Viničná	18.5.2008	50.07	14.42	Kaftan Milan
124	Czech republic	Praha-Viničná	19.5.2008	50.07	14.42	Kaftan Milan
129	Czech republic	Litoměřice	2008	50.53	14.12	Dvorská Zdena
135	Czech republic	Olomouc	2008	49.58	17.25	Zoo Olomouc
139	Czech republic	Uherské Hradiště - Staré město	2008	49.07	17.43	Baláž Vojto
142	Czech republic	Praha-Čimice	2008	50.12	14.42	Baláž Vojto
144	Czech republic	Praha-Prosek	5.6.2008	50.12	14.48	Gvoždík Václav
147	Czech republic	Velké Meziříčí	1.8.2008	49.35	15.93	ZS Pavlov
149	Czech republic	Světlá nad Sázavou	1.10.2008	49.67	15.40	ZS Pavlov
164	Czech republic	Litoměřice	9.6.2008	50.53	14.12	Falco Dolní Týnec

168	Czech republic	Litoměřice	9.6.2008	50.53	14.12	Falco Dolní Týnec
183	Czech republic	Chomutov	2008	50.45	13.40	Zoo Chomutov
209	Czech republic	Rychvald	19.4.2009	49.85	18.37	Bolfíková Barbora, Hulva Pavel, Janko Karel
214	Czech republic	Vratimov	10.10.2008	49.77	18.30	ZS Bartošovice
sk7	Slovakia	Cinobaňa	2009	48.43	19.65	Michal Ferenc
sk8	Slovakia	Poltár	2009	48.42	19.78	Michal Ferenc
sk9	Slovakia	Radovce	2009	48.22	19.82	Michal Ferenc
sk11	Slovakia	Radovce	2009	48.22	19.82	Michal Ferenc
sk12	Slovakia	Bratislava	2009	48.15	17.10	Varadinová Zuzana
sk13	Slovakia	Brusno	2009	48.73	19.37	Mikulíček Petr
sk14	Slovakia	Bánská Bystrica	2009	48.72	19.13	Mikulíček Petr
sk15	Slovakia	Senica	2009	48.67	17.35	Mikulíček Petr
sk16	Slovakia	Bratislava - Bohrova	2009	48.15	17.10	Martin Celuch
sk17	Slovakia	Dojč	2009	48.67	17.25	Martin Celuch
sk20	Slovakia	Mokroluh, okres Bardejov	2.6.2009	48.63	17.13	Martin Celuch
sk21	Slovakia	Prešov	17.6.2009	49.30	21.26	Martin Celuch
sk22	Slovakia	Tulčík, okres Prešov	20.6.2009	49.31	21.21	Martin Celuch
sk23	Slovakia	Tulčík, okres Prešov	20.6.2009	48.99	21.24	Martin Celuch
sk24	Slovakia	Košice	2.7.2009	49.09	21.31	Martin Celuch
sk25	Slovakia	Smižany, okres Spišská Nová Ves	26.7.2009	49.09	21.31	Benda Petr
sk28	Slovakia	Okres Prešov	24.9.2009	48.75	21.27	Benda Petr
sk29	Slovakia	Čierny Balog	NA	48.96	20.51	Bolfíková Barbora
sk30	Slovakia	Lula	NA	49.14	18.36	Bolfíková Barbora
sk34	Slovakia	Modrany	1.8.2010	47.82	18.36	Noga Michal
sk44	Slovakia	Bratislava	NA	48.18	17.06	Bolfíková Barbora
sk48	Slovakia	Spišská Nová Ves	2011	48.95	20.56	Hájková Andrea
sk49	Slovakia	Spišská Nová Ves	2011	48.95	20.56	Hájková Andrea
sk50	Slovakia	Spišská Nová Ves	2011	48.95	20.56	Hájková Andrea
sk51	Slovakia	Spišská Nová Ves	2011	48.95	20.56	Hájková Andrea

Tab. č. 2. Seznam vzorků použitých k analýze. Zkratka NA značí neznámé datum odběru tkáně.

2.2. Izolace DNA

K izolaci DNA z tkáně byl použit kit DNA Blood and Tissue Kit od firmy Qiagen, protokol Purification of Total DNA from Animal Tissue s dvěmi modifikacemi - při lyzi tkáně bylo použito 15 μ l proteinázy K a v posledním kroku bylo k eluci DNA z membrány použito 100 μ l elučního pufru. Koncentrace vyizolované DNA byla změřena spektrofotometricky na přístroji ND-1000 (Nanodrop®) v laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty. Izoláty byly skladovány při teplotě - 20°C.

2.3. Mikrosatelity

2.3.1. PCR

Mikrosatelity DNA jsou tvořeny krátkými segmenty DNA, ve kterých se opakuje určitý motiv (repetice). Nejčastěji jej tvoří di-, tri-, tetra- nukleotidy, existují však i mikrosatelity složené, které se skládají ze dvou opakujících se a na sebe navazujících sekvencí. Počet opakování motivu definuje alelu. V tomto případě jde o dinukleotidové repetice, s výjimkou EEU 43, kdy se jedná o složený mikrosatelit s motivem opakování d(GT)₂₅ (GA)₆. Pro amplifikaci celkem deseti mikrosatelitových lokusů byly použity dva specifické primery - fluorescenčně značený forward primer (6-FAM, VIC, NED a PET) a neznačený reverse primer.

Bylo použito celkem 10 mikrosatelitových lokusů, vyvinutých původně pro druh *Erinaceus europaeus* (Becher & Griffiths 1998, Henderson et al. 2000). Tyto primery byly již úspěšně použity pro populační studie u druhu *Erinaceus roumanicus* (Bolfíková & Hulva 2012). Primery byly rozděleny do dvou sad SB1 a SB2 podle optimální teploty přisedání primerů. Přehled primerů, jejich sekvence, jednotek opakování, fluorescenčního značení, teploty přisedání primerů, je uveden v Tab. č. 3.

lokus	Sekvence primeru (5'— > 3')	jednotka opakování	fluorescenční značení	teplota přisedání primerů	sada	publikováno
EEU2	F: GTAGGGACCGAGGGCTTGAAGT R: GACTGGCATTACCCCTAAAACACAT	d(CA) ₁₈	PET	62° C	SB2	Becher & Griffiths 1997
EEU3	F: TCAACAGAAGACAGGAGCAGATACAGG R: GAACTTCCACCAGAACATCAAGGCT	d(CA) ₁₈	FAM	57° C	SB1	Becher & Griffiths 1997
EEU4	F: GTGGTTAGAGCAGCAAGGACT R: AGCTCTTAGCACTGGGTCTGA	d(CA) ₁₉	NED	62° C	SB2	Becher & Griffiths 1997
EEU5	F: TGCATGAGGAACCAAATTCAA R: CAGCATGGATGTCCCACTACT	d(CA) ₂₄	VIC	57° C	SB1	Becher & Griffiths 1997
EEU6	F: CAGTGAAGTTAAGGGTGGCTTT R: TATGCTGGGTGGGTCTCTTCT	d(GA) ₁₈	PET	57° C	SB1	Becher & Griffiths 1997
EEU12H	F: CTGCATGTACCTCTCCTCTACCTC R: TTTTCTTTTTCCACCGGTGTTATC	d(CT) ₁₅	FAM	62° C	SB2	Henderson et al. 2000
EEU36H	F: GACTCTGGAAC TCAAACCAGG R: GGTAGACAGAGAGATCAAAGGGA	d(CT) ₂₁	NED	57° C	SB1	Henderson et al. 2000
EEU37H	F: ATGAGGTGAGGCTTACCAAAAA R: GGAATCTCACAGATGTAAAGTTCTAGC	d(GT) ₂₃	VIC	62° C	SB2	Henderson et al. 2000
EEU43H	F: CCATGTACAGTGGATTTACCTGC R: ACCCTAGGAGCAACTTGGAGAT	d(GT) ₂₅ (GA) ₆	FAM	62° C	SB2	Henderson et al. 2000
EEU54H	F: CATCGGCTCAGCATTCTCTT R: ATCCCCAGAGTTGTGTTTGC	d(GA) ₃₁	NED	57° C	SB1	Henderson et al. 2000

Tab. č. 3. Přehled primerů, jejich sekvence, jednotek opakování, fluorescenčního značení, teploty přisedání primerů.

PCR reakce probíhala v celkovém objemu 10 μ l, složení reakční směsi je uvedeno v Tab. č. 4., program termocykleru pro sadu primerů SB1 a SB2 v Tab. č. 5. a 6.

	C_{final}	V_{final}
PCR master mix	1x	5 μ l
primer mix	0,2 μ M	1 μ l
Rnase-free water		3 μ l
DNA	4 ng/ μ l	1 μ l
celkem		10 μ l

Tab. č. 4. Složení reakční směsi.

cyklus	T (°C)	t (min)
1 (1x)	95° C	5
2 (29x)	95° C	0,5
2	57° C	1
2	72° C	0,5
3 (1x)	72° C	5
4 (1x)	12° C	∞

Tab. č. 5. Program termocykleru pro sadu primerů SB1.

cyklus	T (°C)	t (min)
1 (1x)	95° C	5
2 (30x)	95° C	0,5
2	62° C	1
2	72° C	1
3 (1x)	72° C	10
4 (1x)	20° C	∞

Tab. č. 6. Program termocykleru pro sadu primerů SB2.

2.3.2 Fragmentační analýza

Fragmentační analýza probíhala v Laboratoři sekvenace DNA Přírodovědecké fakulty na sekvenátoru ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer s polymerem POP 4 a standardem DS-33. Složení reakční směsi bylo následující: 9 µl formamidu, 0,5 µl PCR produktu, 0,5 µl standardu (Gene Scan™ 500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems). Směs byla denaturována při teplotě 95°C po dobu pěti minut, následně zchlazena na teplotu 4°C a skladována při -20°C.

2.4. Analýza mikrosatelitových dat

2.4.1. Charakteristika genetické variability

K odečtení délky mikrosatelitových alel byl použit program GeneMarker V1.85 (www.softgenetics.com). Z celkového počtu deseti lokusů bylo devět polymorfních a jeden monomorfní (lokus EEU36, který byl z dalších analýz vyřazen). Celkový počet genotypovaných jedinců byl 288, do dalších analýz bylo ovšem použito 260 jedinců. Vyřazení jedinci pocházeli z řeckých ostrovů Rhodos a Kós a jednalo se o druh *Erinaceus concolor*.

Zaokrouhlení odečtených alel bylo provedeno programem AutoBin (<http://www4.bordeauxaquitaine.inra.fr/biogeco/layout/set/print/Ressources/Logiciels/Autobin>), pracujícím s využitím funkce Makra (Microsoft Visual Basic) v Excelu.

Přítomnost nulových alel a dalších artefaktů vzniklých při genotypování jedinců jako jsou mutace v místě nasedání primerů, tzv. stutter bands a špatná amplifikace velkých alel, byla testována programem Micro-Checker (van Oosterhout et al. 2004). Tyto chyby při amplifikaci *in vitro* mohou způsobit falešné odchylky od Hardy - Weibergovy rovnováhy a tím i nepřesné výsledky dalších analýz.

Výpočet populačních parametrů proběhl v online dostupném programu GenePop V4 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) (Rousset 2008) a FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995). V programu GenePop byly vypočteny hodnoty fixačního indexu pro každý lokus i souhrnně pro všechny lokusy, dále zde byl testován signifikantní nedostatek heterozygotů pro každou ze subpopulací. Fixační index (F_{ST}) vyjadřuje míru genetické vzdálenosti mezi jednotlivými (sub)populacemi, vychází z předpokladu, že průměrná heterozygotita všech subpopulací je menší než by byla očekávaná heterozygotita v panmiktické populaci, testuje tedy vliv genetického driftu v populaci. Nabývá hodnot od 0, kdy jsou frekvence alel v populaci

vyrovnané, do 1, kdy je alela v populaci fixována. Bližší určení hodnoty F_{ST} je následující: 0 – 0.05 malá diferenciace, 0.05 – 0.15 střední diferenciace, 0.15 – 0.25 velká diferenciace, > 0.25 velmi velká diferenciace.

V programu FSTAT byly pro jednotlivé lokusy zjištěny odchylky od Hardy - Weinbergovy rovnováhy, počet alel, koeficient inbreedingu (F_{is}) a hodnoty allelic richness. Koeficient inbreedingu (F_{is}) vypočítává pokles heterozygotnosti následkem příbuzenského křížení - v tomto případě jde o výpočet porovnávající pokles heterozygotnosti jedince, oproti heterozygotnosti, které by dosahoval v hypotetické panmiktické populaci, nabývá hodnot od - 1, kdy v populaci neexistují homozygoti, do 1, kdy zde se v populaci nevyskytují heterozygoti. Hodnoty allelic richness slouží k odhadu počtu alel na lokus pro stejný počet jedinců mezi populacemi, nejsou tedy závislé na počtu vzorků z jednotlivých populací. Jsou využívány k detekci historicky proběhlých procesů jako je Efekt hrdla láhve a poklesy velikosti populace.

FSTAT využívá statistické modely Nei (odhad heterozygotity pro jednotlivé lokusy a celek, odhad frekvence alel) a Weir & Cockerham (indexy fixace pro alelu, lokus a celek) a testuje je s použitím randomizačních metod.

Očekávaná ($H_{exp.}$) a pozorovaná heterozygotnost ($H_{obs.}$) byly vypočteny programem Genetix (popis viz. níže).

2.4.2. Genetická struktura

Pro výpočet a charakterizaci neznámé populační struktury byl použit program Structure 2.2 (Pritchard et al. 2000), využívající principu Baysiánské analýzy. Program mj. na základě genetických distancí vloženého datasetu určuje nejpravděpodobnější rozdělení individuí do populací (klastrů), značených K, a vypočítává věrohodnost (likelihood) tohoto modelu. Zároveň určuje pravděpodobnost příslušnosti jedince do určeného klastru, vyjádřené hodnotou q. Počet testovaných K byl na začátek zadán v intervalu od 1 do 10 a postupně korelován podle předběžných výsledků. V konečném běhu byla použita informace o zařazení jedinců do subpopulací podle přibližné geografické lokalizace (podle státu původu) a byli seřazeni podle geografického gradientu (přibližně zjištěného předchozími analýzami) od severozápadu na jihovýchod Evropy. Parametry finálního běhu programu jsou následující: počet opakování MCMC (Markov Chain Monte-Carl) = 10^6 , burn - in - perioda = 10^5 , admixture model korelovaných frekvencí, počet K = 1 - 14, počet opakování (iteration) pro jednotlivá K = 5.

Výsledky finálního běhu programu Structure byly následně vyhodnoceny v programu Structure Harvester (Earl & vonHoldt 2012) dostupném online (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). Tento program vyhodnocuje množství dat vygenerovaných programem Structure pro jednotlivá K a s využitím metody Evanno (Evanno et al. 2005), pracující s hodnotou ΔK , posuzuje, pro které K je v datech největší podpora. Výstup z tohoto programu také poskytuje soubory použitelné k dalším analýzám. Hodnoty vygenerované programem Structure Harvester na základě pěti opakování (iteration) programu Structure pro jednotlivá K byly zprůměrovány v programu Clumpp 1.1.2. (Jakobsson & Rosenberg).

Pro grafickou vizualizaci souborů poskytnutých programem Structure, formátovaných pomocí Structure Harvester a zprůměrovaných programem Clumpp, byl použit program Distruct 1.1 (Rosenberg 2004). Distruct umožňuje zobrazit koeficient příslušnosti individua, určit seřazení jednotlivých K, jejich barevné odlišení a další grafické detaily.

Vizualizace rozložení genotypů ve 2D a 3D prostoru byla provedena v programu Genetix 4.0.5.2 (Belkhir et al. 2004). Program využívá princip faktoriální korespondenční analýzy (FCA), jejímž výsledkem je grafická reprezentace vztahů mezi proměnnými (v tomto případě vyjádřeném genotypovou frekvencí). Výstupem je zobrazení pozice jednotlivých genotypů v prostoru nebo v grafu podle počtu souřadnicových os.

2.4.3. Krajinná genetika

K zobrazení distribuce genotypů v závislosti na jejich geografické příslušnosti byl použit program Geneland 4.0.4 (Guillot et al. 2005). Geneland pracuje s využitím prostředí a programovacího jazyka statistického softwaru R (<http://cran.r-project.org/bin/windows/base/>) a je využíván pro statistické zpracování populačně - genetických dat. Provádí Bayesiánské klastrování do skupin na základě genotypových frekvencí, zároveň však zohledňuje geografickou polohu jedinců udanou pomocí GPS souřadnic (aktuální verze programu je ovšem schopná analyzovat také fenotypová data). Geneland, stejně jako Structure je schopen pracovat s *a priori* neznámou populační strukturou, vyhledává subpopulace, které se nacházejí přibližně v Hardy - Weinbergově rovnováze, a na mapě je graficky odlišuje. Tento nový přístup tzv. krajinné genetiky (Manel et al. 2003) umožňuje detekci a lokalizaci genetických diskontinuit mezi populacemi a korelaci těchto diskontinuit s lokálními charakteristikami krajiny (Guillot et al. 2005). Počet opakování MCMC byl nastaven na 500

000, s ukládáním každé sté generace s modelem nekorelovaných frekvencí, počet předpokládaných populací zadán v intervalu 1 až 15, dále byl nastaven spatial model, false null allele model a tři nezávislé běhy programu. Byl zvolen model nekorelovaných frekvencí, protože je méně náchylný k nestabilitě algoritmu a odchylkám od daného předpokládaného modelu (tj. přítomnosti isolation - by - distance).

V programu Alleles In Space (Miller 2005) byla zpracována statistická korelační analýza, Mantel test (Mantel 1967), vyhodnocující vztahy mezi genetickou a geografickou vzdáleností jednotlivých individuí, počet opakování byl nastaven na 1000. Dále byla provedena analýza tvaru genetické krajiny (Genetic landscape shape analysis). Byly spočteny genetické distance a pomocí Delauneyovy triangulace byly geograficky přiřazeny ke středům spojnic jednotlivých lokalit. Pak byla provedena interpolační procedura určující předpokládané genetické distance v rámci pravidelné mřížky o jednotce cca 15 km překrývající zkoumané území a následně byl vytvořen graf těchto interpolovaných genetických distancí. Vrcholy představují oblasti, kde genetické distance jsou nadprůměrné a mohou proto korelovat s oblastmi bariér genového toku, údolí reprezentují oblasti s podprůměrnými genetickými distancemi.

3. Výsledky

3.1. Detekce nulových alel

Analýza datasetu provedená programem Micro-Checker nezjistila chyby v genotypování v důsledku špatné amplifikace velkých alel, stejně tak nezjistila přítomnost stutter - bands. Nulové alely byly přítomné u některých lokusů, odhadnutá frekvence se lišila mezi jednotlivými lokusy a populacemi (viz. Appendix 1). Dva lokusy v případě krétské populace vykazovaly vysokou frekvenci výskytu nulových alel - EEU12H (0,2432) a EEU3 (0,2099). Největší množství nulových alel vykazovala balkánská subpopulace (při rozdělení datasetu na tři populace, viz. níže), popř. v rámci Balkánu pak rumunská subpopulace (při rozdělení datasetu na sedm subpopulací, viz. níže).

3.2. Genetická variabilita jednotlivých lokusů

Devět mikrosatelitových lokusů použitých k analýze bylo polymorfních. Počet alel u jednotlivých lokusů se pro všechny populace pohyboval v rozmezí od 5 (lokus EEU 12H) do 23 (lokus EEU 43H), tedy průměrně 16 alel na lokus.

Charakteristiky jednotlivých lokusů (počet alel, koeficient inbreedingu (F_{is}), pozorovaná ($H_{obs.}$) a očekávaná heterozygotnost ($H_{exp.}$)), byly vypočteny pro tři a sedm subpopulací určených pomocí Bayesiánského klastrování v programu Structure (viz. níže). Tyto charakteristiky jsou shrnuté v Tab. č. 7 a 8. Hodnoty allelic richness jsou shrnuty v Tab. č. 9 a 10, nejnižší hodnoty alelické diverzity vykazovala (v obou případech při rozdělení na tři a sedm populací) krétská populace.

Pozorovaná heterozygotnost ($H_{obs.}$) byla ve všech případech nižší než očekávaná heterozygotnost ($H_{exp.}$) Analýza v programu GenePop, ukázala signifikantní nedostatek heterozygotů ($p < 0,01$) pro všechny populace a všechny lokusy, při obou rozdělení na tři i na sedm populací.

		Kréta				Česká republika					Balkán, Rumunsko, Slovensko, Maďarsko				
lokus	velikost alel	počet alel	H exp.	H obs.	Fis	lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis	lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis
EEU5	101-148	10	0,7335	0,7917	-0,058	EEU5*	7	0,5643	0,4286	0,250	EEU5*	19	0,8811	0,7647	0,135
EEU6	140-175	6	0,3611	0,4167	-0,133	EEU6*	8	0,7893	0,6735	0,157	EEU6*	14	0,8457	0,7647	0,098
EEU43H	158-199	5	0,5799	0,6667	-0,129	EEU43H	14	0,8181	0,7292	0,119	EEU43H*	20	0,8693	0,7213	0,173
EEU54H	269-299	7	0,6529	0,5000	0,256	EEU54H*	7	0,7135	0,5833	0,193	EEU54H*	14	0,6657	0,5349	0,199
EEU12H*	88-104	2	0,4849	0,2174	0,567	EEU12H	1	0	0	-----	EEU12H*	5	0,2125	0,1720	0,193
EEU4	127-174	6	0,5469	0,5000	0,107	EEU4*	6	0,7674	0,5918	0,239	EEU4*	16	0,8684	0,7784	0,106
EEU3*	135-187	6	0,5842	0,3333	0,447	EEU3	12	0,5319	0,4898	0,089	EEU3*	20	0,8931	0,7297	0,186
EEU37H	239-260	2	0,0444	0,0455	0	EEU37H	4	0,6608	0,6122	0,084	EEU37H*	9	0,7465	0,6180	0,175
EEU2	246-292	6	0,7311	0,5333	0,302	EEU2	8	0,8509	0,8125	0,056	EEU2*	17	0,8660	0,6897	0,207
celkově		6	0,5243	0,4292	0,17	celkově	7	0,6329	0,5468	0,134	celkově	15	0,7609	0,6415	0,164

Tab. č. 7. Genetická variabilita jednotlivých lokusů při rozdělení datasetu na tři populace. Název lokusu, celkový rozsah velikosti alel, počet alel pro jednotlivé lokusy a populace, H exp. = očekávaná heterozygotnost, H obs. = pozorovaná heterozygotnost, F_{is} = koeficient inbreedingu, * = pravděpodobný výskyt nulových alel.

Kréta					Česká republika					Bulharsko, Řecko, Makedonie, Srbsko, Srbsko-Vojvodina, Černá Hora				
lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis	lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis	lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis
EEU5	10	0,7335	0,7917	-0,058	EEU5*	7	0,5643	0,4286	0,250	EEU5	11	0,8694	0,7805	0,114
EEU6	6	0,3611	0,4167	-0,133	EEU6	8	0,7893	0,6735	0,157	EEU6	11	0,7793	0,7317	0,073
EEU43H	5	0,5799	0,6667	-0,129	EEU43H	14	0,8181	0,7292	0,119	EEU43H	12	0,8792	0,8293	0,069
EEU54H	7	0,6529	0,5000	0,256	EEU54H*	7	0,7135	0,5833	0,193	EEU54H	10	0,7195	0,6585	0,097
EEU12H*	2	0,4849	0,2174	0,567	EEU12H	1	0	0	-----	EEU12H	5	0,3873	0,3659	0,068
EEU4	6	0,5469	0,5000	0,107	EEU4*	6	0,7674	0,5918	0,239	EEU4	13	0,8522	0,8250	0,045
EEU3*	6	0,5842	0,3333	0,447	EEU3	12	0,5319	0,4898	0,089	EEU3*	13	0,8863	0,7179	0,202
EEU37H	2	0,0444	0,0455	0	EEU37H	4	0,6608	0,6122	0,084	EEU37H	6	0,6884	0,6250	0,105
EEU2	6	0,7311	0,5333	0,302	EEU2	8	0,8509	0,8125	0,056	EEU2	8	0,8035	0,6970	0,148
celkově	6	0,5243	0,4292	0,167	celkově	7	0,712	0,6151	0,134	celkově	10	0,7628	0,6923	0,102

Rumunsko					Slovinsko					Slovensko + Maďarsko				
lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis	lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis	lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis
EEU5	14	0,8658	0,9355	-0,064	EEU5	9	0,8061	0,6842	0,164	EEU5*	12	0,8503	0,7059	0,184
EEU6	11	0,8377	0,8387	0,015	EEU6	9	0,7967	0,7632	0,055	EEU6	6	0,7535	0,6176	0,195
EEU43H*	13	0,8799	0,6897	0,233	EEU43H	9	0,8101	0,7297	0,113	EEU43H	14	0,7782	0,7273	0,081
EEU54H*	5	0,7211	0,5000	0,328	EEU54H*	6	0,3845	0,2571	0,344	EEU54H	10	0,6791	0,5882	0,148
EEU12H*	3	0,3311	0,1667	0,509	EEU12H	2	0,1454	0,1579	-0,072	EEU12H	2	0,0843	0,0882	-0,031
EEU4*	10	0,8377	0,6774	0,207	EEU4	8	0,7656	0,7105	0,085	EEU4*	10	0,8607	0,7353	0,160
EEU3*	11	0,8044	0,6129	0,253	EEU3	10	0,8393	0,8684	-0,021	EEU3	12	0,8663	0,7941	0,098
EEU37H*	5	0,7030	0,4444	0,384	EEU37H	7	0,8033	0,6857	0,160	EEU37H	3	0,6423	0,6176	0,053
EEU2*	9	0,7883	0,5714	0,309	EEU2	12	0,8083	0,7000	0,151	EEU2	10	0,8145	0,7879	0,048
celkově	9	0,7521	0,6171	0,242	celkově	8	0,6844	0,6071	0,102	celkově	9	0,7032	0,6291	0,097

Chorvatsko + Bosna a Hercegovina				
lokus	počet alel	H exp.	H obs.	Fis
EEU5*	10	0,8659	0,7442	0,152
EEU6	10	0,8761	0,8605	0,030
EEU43H*	11	0,8229	0,6279	0,248
EEU54H	6	0,6481	0,6250	0,048
EEU12H	2	0,0673	0,0698	-0,024
EEU4	11	0,8262	0,9048	-0,083
EEU3*	13	0,8467	0,6512	0,242
EEU37H	8	0,7466	0,6667	0,119
EEU2*	11	0,8735	0,6286	0,294
celkově	9	0,7125	0,6442	0,114

Tab. č. 8. Genetická variabilita jednotlivých lokusů při rozdělení datasetu na sedm populací. Název lokusu, počet alel pro jednotlivé lokusy a populace, H exp. = očekávaná heterozygotnost, H obs. = pozorovaná heterozygotnost, F_{is} = koeficient inbreedingu, * = pravděpodobný výskyt nulových alel.

lokus	Kréta	Česká republika	Balkán, Rumunsko, Slovensko, Maďarsko
EEU5	8,060	5,392	9,849
EEU6	4,812	6,241	9,015
EEU43H	4,576	9,260	9,347
EEU54H	5,949	5,480	6,347
EEU12H	2,000	1,000	3,001
EEU4	4,739	5,746	9,685
EEU3	5,198	7,279	11,331
EEU37H	1,682	3,306	6,168
EEU2	6,000	7,693	9,255
celkem	4,493	5,943	8,222

Tab. č. 9. Hodnoty allelic richness při rozdělení datasetu na tři populace.

lokus	Kréta	Česká republika	Bulharsko, Řecko, Srbsko, Makedonie, Černá Hora, Srbsko-Vojvodina	Rumunsko	Slovinsko	Slovensko + Maďarsko	Chorvatsko + Bosna a Hercegovina
EEU5	7,822	5,284	9,464	10,613	7,170	9,000	8,342
EEU6	4,659	6,140	8,728	8,398	7,120	5,600	8,823
EEU43H	4,514	8,991	9,450	10,440	7,593	8,795	8,010
EEU54H	5,781	5,401	7,012	4,632	4,071	7,154	4,048
EEU12H	2,000	1,000	3,788	2,719	1,944	1,803	1,698
EEU4	4,582	5,705	9,468	8,180	6,759	8,835	8,415
EEU3	5,092	7,017	10,569	8,417	8,118	9,632	9,628
EEU37H	1,636	3,286	5,275	4,668	6,537	3,000	6,207
EEU2	5,864	7,626	7,145	9,000	9,196	7,688	9,201
celkem	4,994	6,187	7,912	6,575	6,317	7,318	7,045

Tab. č. 10. Hodnoty allelic richness při rozdělení datasetu na sedm populací

3.3. Genetická variabilita populací

V programu GenePop byly zjištěny hodnoty párového fixačního indexu (jako proxy genetické distance) mezi třemi a mezi sedmi populacemi (Tab. č. 11 a 12).

Nejvyšší hodnota fixačního indexu a tedy největší genetická diferenciace při rozdělení na tři populace byla podle očekávání mezi populací z Kréty a České republiky, hodnota $F_{ST} = 0,2889$ je v rozmezí silná diferenciace (viz. Metodika). Druhá největší distance byla mezi populací z Kréty a Balkánského poloostrova a ostatních států (Rumunska, Maďarska, Slovenska) ($F_{ST} = 0,1804$), nejbližší si byly populace z Balkánského poloostrova a České republiky ($F_{ST} = 0,0789$).

Při rozdělení na sedm populací nejvyšších hodnot F_{ST} dosahovala Kréta (C) ve srovnání se všemi ostatními populacemi, největší distance byla opět mezi Českou republikou (CZ) a Krétou. Krétě nejbližší populací byla populace tvořená jedinci z Bulharska, Řecka, Makedonie, Srbska, Srbska-Vojvodiny a Černé Hory (B). Další populací, která vykazovala vyšší hodnoty F_{ST} při srovnání s jinými populacemi, byla Česká republika. Populace tvořená státy Bulharsko, Řecko, Makedonie, Srbsko, Srbsko-Vojvodina a Černá Hora (B) byla blízká populacím z Rumunska (RO), Slovenska + Maďarska (SK+HU), Chorvatska + Bosny a Hercegoviny (HR+BiH), vyšších hodnot F_{ST} dosahovala při srovnání se slovinskou populací (SI). Relativně vzdálené se jeví populace ze Slovinska (SI) a Rumunska (RO) ($F_{ST} = 0,0553$), Slovinska a Slovenska + Maďarska (SK + HU) ($F_{ST} = 0,0584$) a populace ze Slovenska + Maďarska (SK + HU) vs. Chorvatska a Bosny a Hercegoviny (HR + BiH) ($F_{ST} = 0,0660$).

populace	B+RO+SK+HU	C
C	0,1804	
CZ	0,0789	0,2889

Tab. č. 11. Hodnoty párového F_{ST} (genetické distance) mezi třemi subpopulacemi celkově pro všechny lokusy. C = Kréta, CZ = Česká republika, B+RO+SK+HU = Balkán, Rumunsko, Slovensko, Maďarsko.

populace	C	CZ	B	RO	SI	SK + HU
CZ	0,2889					
B	0,1631	0,0962				
RO	0,2155	0,0849	0,0204			
SI	0,2363	0,1303	0,0426	0,0553		
SK + HU	0,2038	0,0742	0,0293	0,0355	0,0584	
HR + BiH	0,2348	0,1124	0,0273	0,0335	0,0381	0,0660

Tab. č. 12. Hodnoty párového F_{ST} (genetické distance) mezi sedmi subpopulacemi celkově pro všechny lokusy. C = Kréta, CZ = Česká republika, B = Bulharsko, Řecko, Makedonie, Srbsko, Srbsko-Vojvodina, Černá Hora, RO = Rumunsko, SI = Slovinsko, SK + HU = Slovensko + Maďarsko, HR + BiH = Chorvatsko + Bosna a Hercegovina.

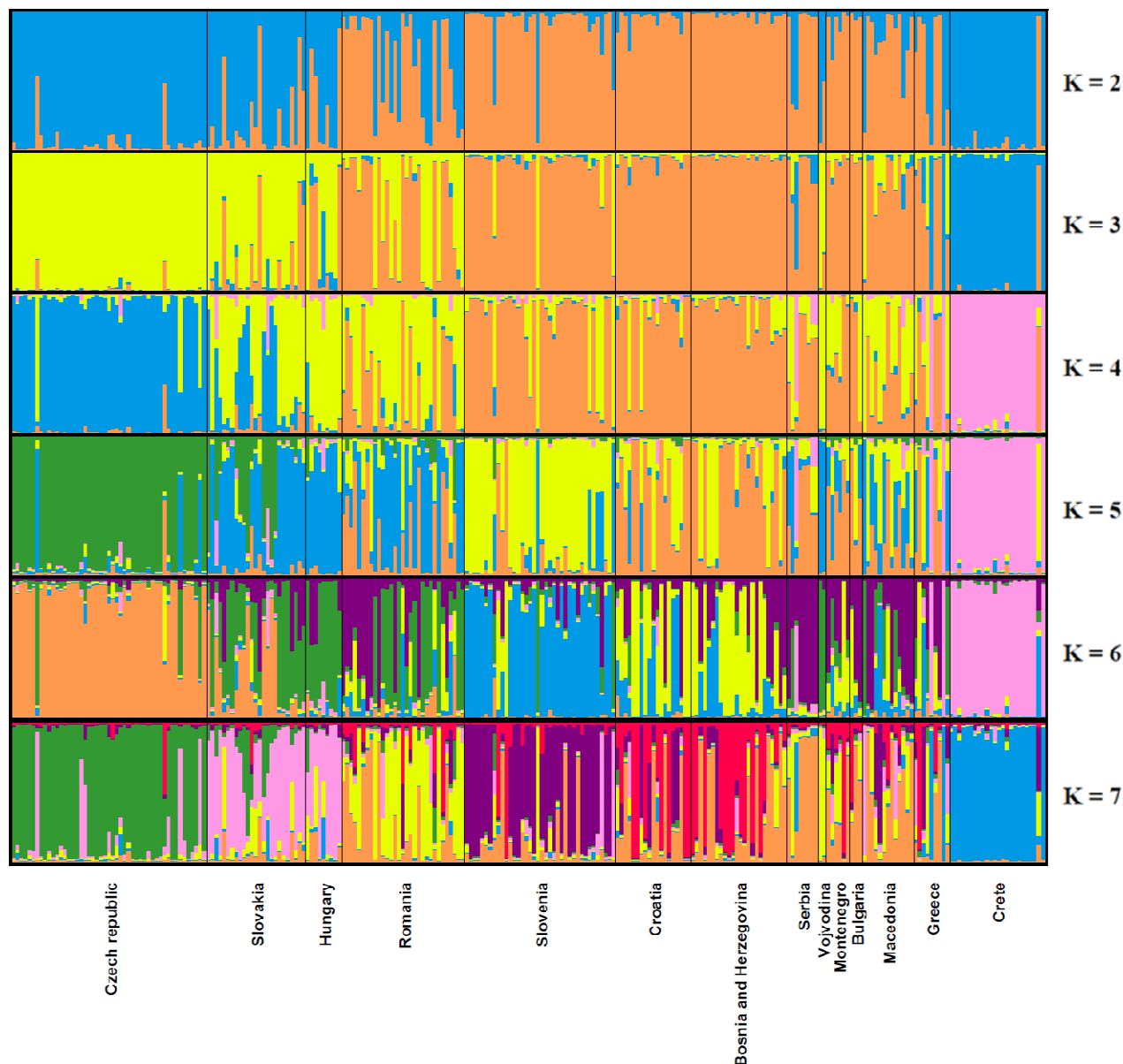
3.4. Bayesiánská klastrová analýza

Posteriorní pravděpodobnosti zařazení jedince do jednotlivých klastrů pomocí Bayesiánské analýzy byly zjištěny v programu Structure. Jedinci byli a priori rozděleni do čtrnácti subpopulací podle jednotlivých států, ze kterých pocházeli (navíc byli odděleni jedinci původem ze srbské autonomní oblasti Vojvodiny, z důvodu genetické odlišnosti od zbytku Srbska).

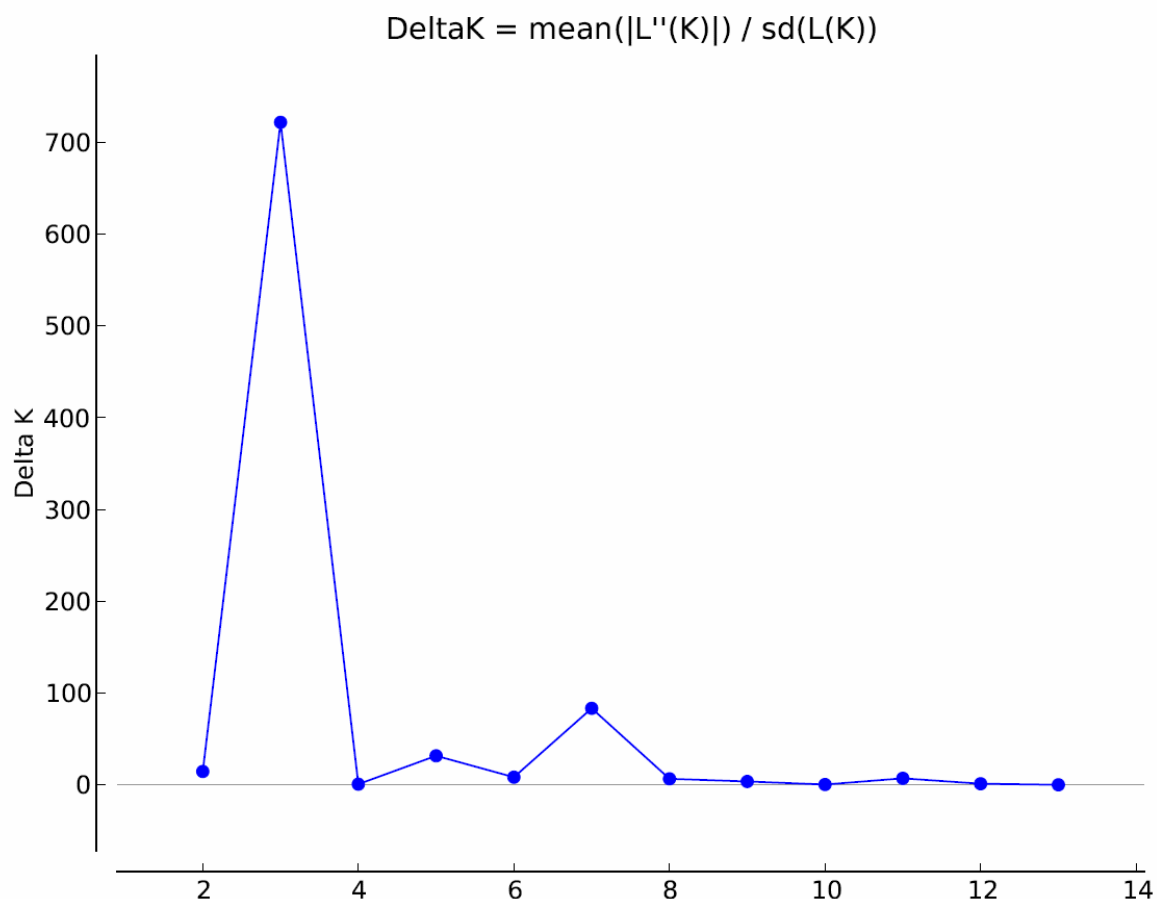
Z celkového počtu testovaných K (1 - 14) se po vynesení hodnot ΔK do grafu, ukázala největší podpora datasetu při rozdělení na tři subpopulace (Obr. č. 8). Při tomto rozdělení (K = 3) se od zbytku populace odlišovali všichni jedinci pocházející z Kréty. Výjimku tvořili dva jedinci původem z řeckého poloostrova Peloponés, kteří klastrovali společně s krétskou populací. Druhou geneticky odlišnou subpopulaci vytvářeli jedinci z České republiky. Jedinci ze Slovenska představovali přechod mezi českou a třetí subpopulací, tvořenou jedinci pocházejícími z Balkánu a přilehlých oblastí. Zajímavým úkazem jsou dva jedinci původem z Vojvodiny, kteří při tomto rozdělení klastroují jinak než zbytek Srbska.

Druhá nejvyšší hodnota ΔK byla získána pro K = 7, tedy rozdělení datasetu na sedm populací (Obr. č. 8). V tomto případě opět docházelo k oddělování populace z Kréty a taktéž zřetelně oddělená zůstala populace z České republiky. Třetí klast tvořili jedinci původem ze Slovenska a Maďarska, čtvrtou populaci tvořilo Rumunsko. Pátou dobře oddělenou populaci tvořilo Slovinsko. Šestou nejednoznačně oddělenou populaci tvořili jedinci z Chorvatska a Bosny a Hercegoviny. Sedmou populací, nejvíce podobnou rumunskému klastu, tvořili jedinci z ostatních balkánských států, tzn. Srbska, Srbska-Vojvodiny, Bulharska, Makedonie, Černé Hory a Řecka. Rozdělení subpopulací pro rostoucí počet K (od 2 do 7), graficky zpracované programem Distruct, je zobrazeno na Obr. č. 7.

Toto oddělení bylo otestováno při vynechání jedinců z České a Slovenské republiky, do jejichž genetické architektury se mohly promítat recentní jevy spojené se vznikem kontaktní zóny. Tento běh podpořil výše popsané rozdělení jednotlivých subpopulací, Nejvyšší podpora byla pro $K = 5$ (dvě subpopulace byly vynechány), Maďarsko v tomto případě klastrovalo společně s Rumunskem namísto se slovenskými jedinci.



Obr. č. 7. Zobrazení posteriorní pravděpodobnosti zařazení jedince do populace vygenerované programem Structure a graficky zpracované programem Distruct. Jednotlivé segmenty reprezentují hodnotu q , určující příslušnost jedince do subpopulace.



Obr. č. 8. Zobrazení výsledků metody podle Evanno et al. (2005), neboli vynesení hodnoty ΔK oproti počtu testovaných K .

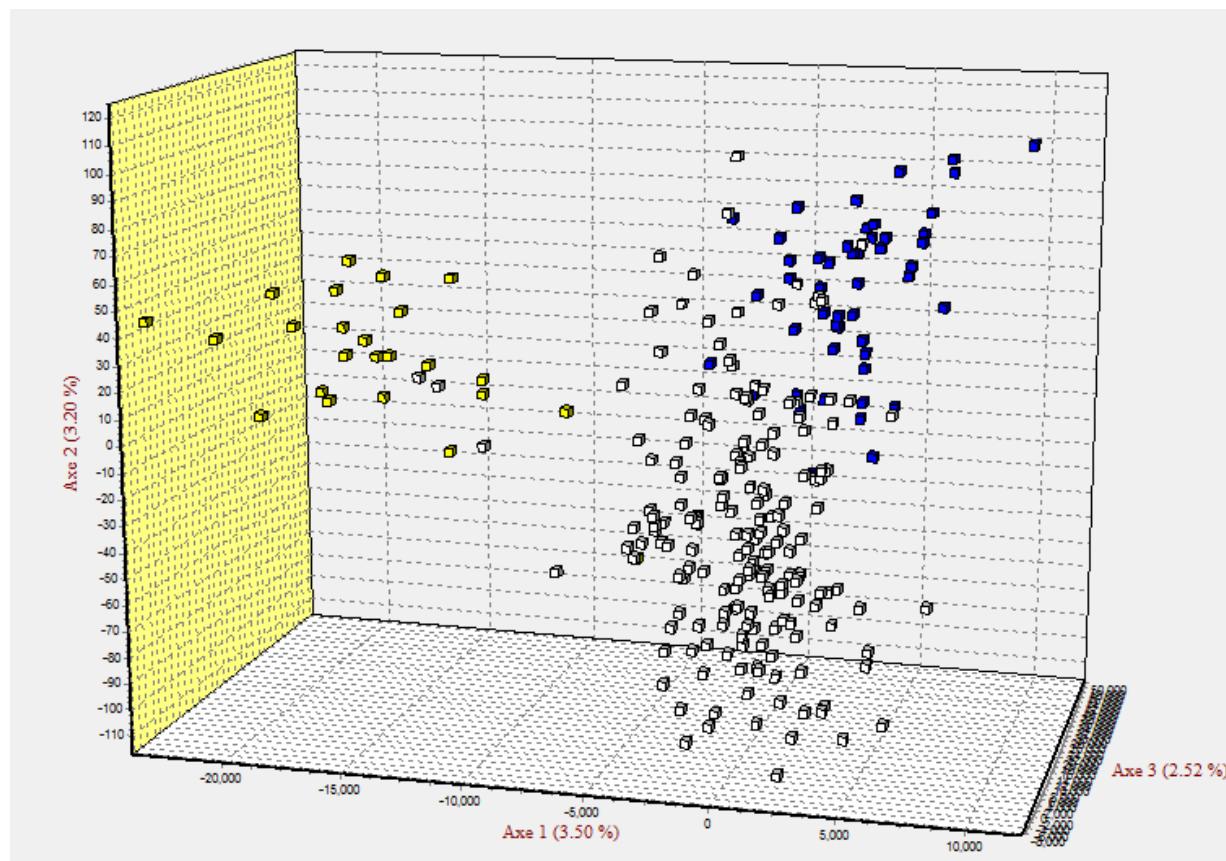
3.5. Faktoriální korespondenční analýza

Genetické distance mezi jednotlivými genotypy pro tři a sedm definovaných populací byly zobrazeny pomocí faktoriální korespondenční analýzy programem Genetix.

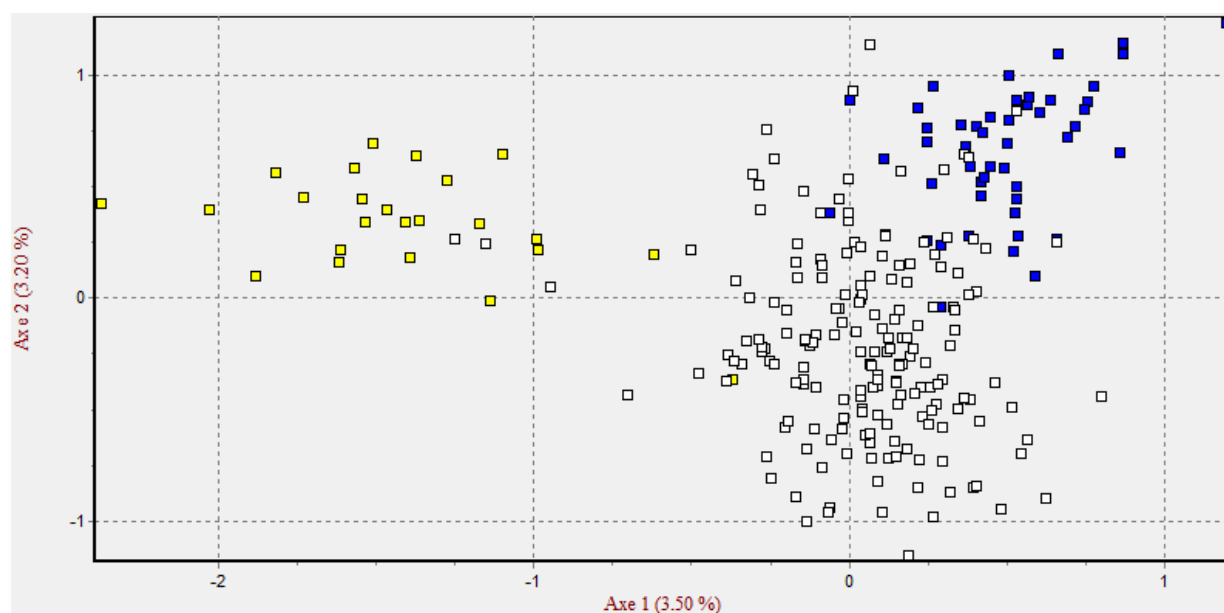
V analýze jsme se na základě výsledků programu Structure rozhodli rozdělit dataset na tři populace a sedm subpopulací. Tato informace neovlivňuje výsledky analýzy, pouze barevně odliší definované populace.

Na Obr. č. 9 a 10 jsou rozlišeny tři subpopulace - Kréta, Česká republika, Balkánský poloostrov + ostatní státy. Zde tvoří oddělený shluk krétská subpopulace, dva jedinci uprostřed tohoto shluku jsou jedinci pocházející z Peloponéskeho poloostrova blízko Kréty, naopak jeden jedinec původem z Kréty jasně klastruje spolu s pevninskou subpopulací. Česká subpopulace se také jeví jako geneticky vzdálená od ostatních států, nicméně je zde kontinuální přechod.

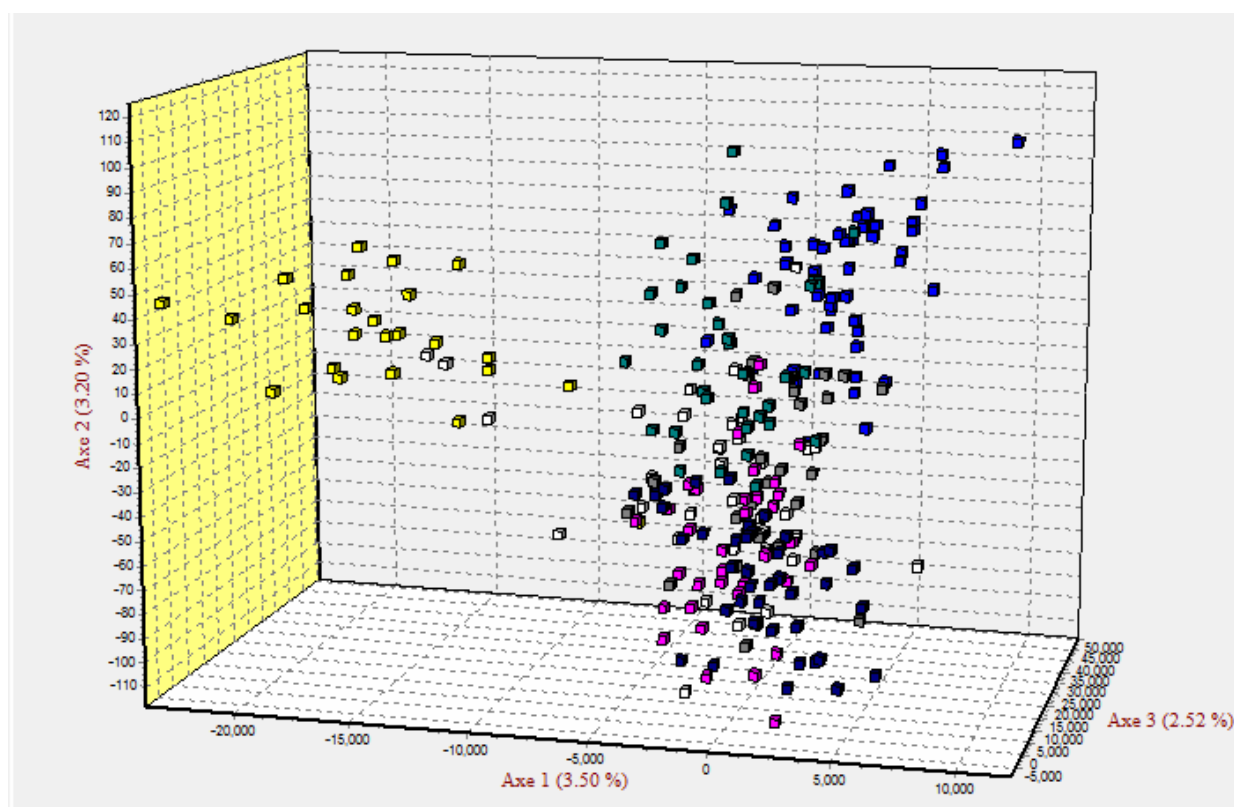
Na Obr. č. 11 a 12 je rozlišeno sedm subpopulací: 1) Kréta, 2) Česká republika, 3) Slovensko + Maďarsko, 4) Rumunsko, 5) Slovinsko, 6) Chorvatsko + Bosna a Hercegovina, 7) Srbsko + Srbsko-Vojvodina + Bulharsko + Makedonie + Černá Hora + Řecko.



Obr. č. 9. Faktoriální korespondenční analýza - 3D zobrazení genetické vzdálenosti mezi třemi definovanými populacemi z Kréty (žlutě, $n = 24$), České republiky (modře, $n = 49$) a z ostatních států (bíle, $n = 187$).

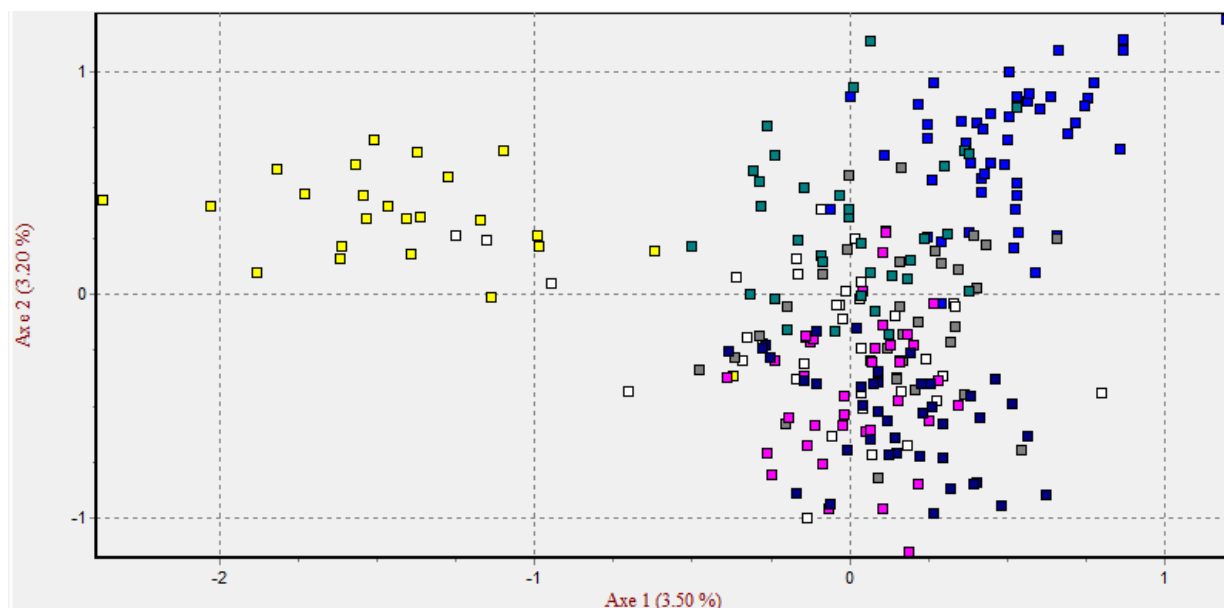


Obr. č. 10. Faktoriální korespondenční analýza - 2D zobrazení genetické vzdálenosti mezi třemi definovanými populacemi z Kréty (žlutě, $n = 24$), České republiky (modře, $n = 49$) a z ostatních států (bíle, $n = 187$).



Obr. č. 11. Faktoriální korespondenční analýza - 3D zobrazení genetické vzdálenosti mezi sedmi definovanými populacemi z Kréty (žlutě, $n = 24$), České republiky (modře, $n = 49$), Slovenska + Maďarska (zeleně, $n = 34$), Rumunská (šedě, $n = 31$), Slovinska (růžově, $n = 38$),

Chorvatska + Bosny a Hercegoviny (tmavě modře, n = 43), Srbska + Srbska-Vojvodiny + Bulharska + Makedonie + Černé Hory + Řecka (bíle, n = 41).



Obr. č. 12. Faktoriální korespondenční analýza - 2D zobrazení genetické vzdálenosti mezi sedmi definovanými populacemi z Kréty (žlutě, n = 24), České republiky (modře, n = 49), Slovenska + Maďarska (zeleně, n = 34), Rumunska (šedě, n = 31), Slovinska (růžově, n = 38), Chorvatska + Bosny a Hercegoviny (tmavě modře, n = 43), Srbska + Srbska-Vojvodiny + Bulharska + Makedonie + Černé Hory + Řecka (bíle, n = 41).

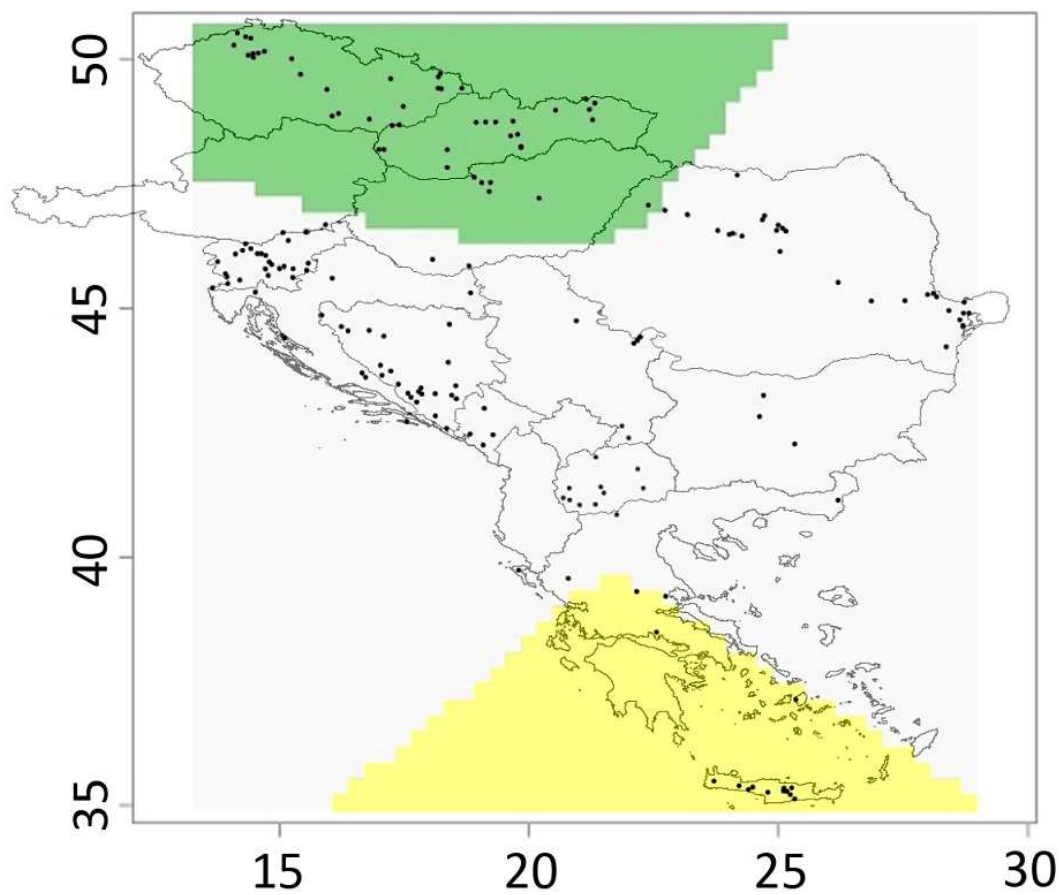
3.6. Krajinná genetika

3.6.1. Geneland

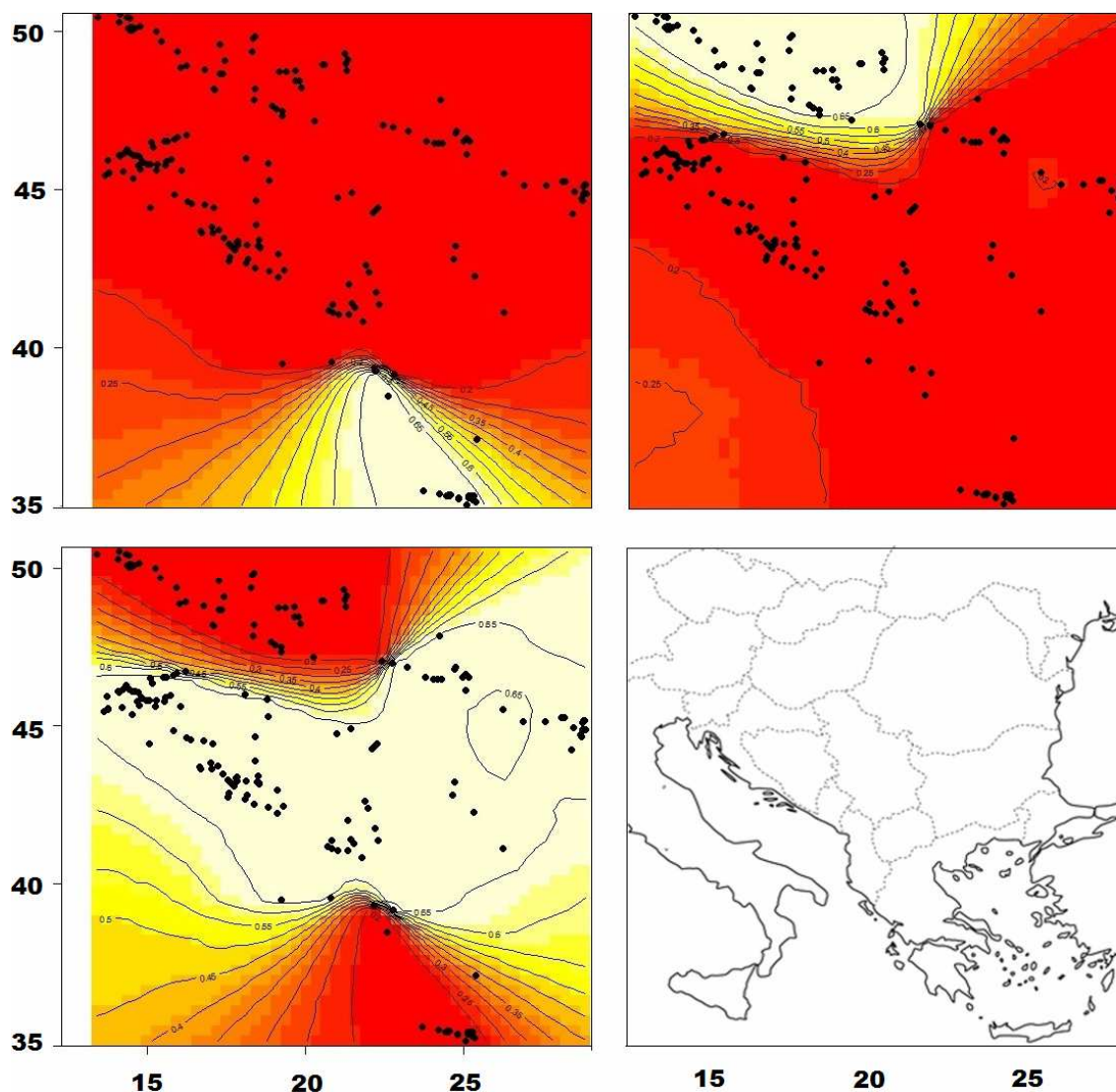
Program Geneland při třech nezávislých opakováních určil jako nejpravděpodobnější rozdělení datasetu do tří populací, jejichž geografická lokalizace je znázorněna na Obr. č. 13. Jednotlivé body reprezentují vzorky a jejich geografickou polohu, barvy oddělují tři určené populace. Osy x a y zobrazují zeměpisnou délku a šířku.

Opět zde dochází k separaci krétské populace a dvou jedinců z Peloponésu (žlutá barva), bílá barva znázorňuje balkánskou pevninu, zelená barva střední Evropu.

Obr. č. 14. znázorňuje tři subpopulace (světlou barvou), linie a odstupňování barev vyjadřují hodnotu posteriorní pravděpodobnosti příslušnosti individuů do subpopulace, body reprezentují jednotlivá individua.



Obr. č. 13. Grafický výstup z programu Geneland, osa x znázorňuje zeměpisnou délku, osa y zeměpisnou šířku, jednotlivé body reprezentují vzorky a jejich lokalizaci na mapě, vytvořené pomocí GIS.



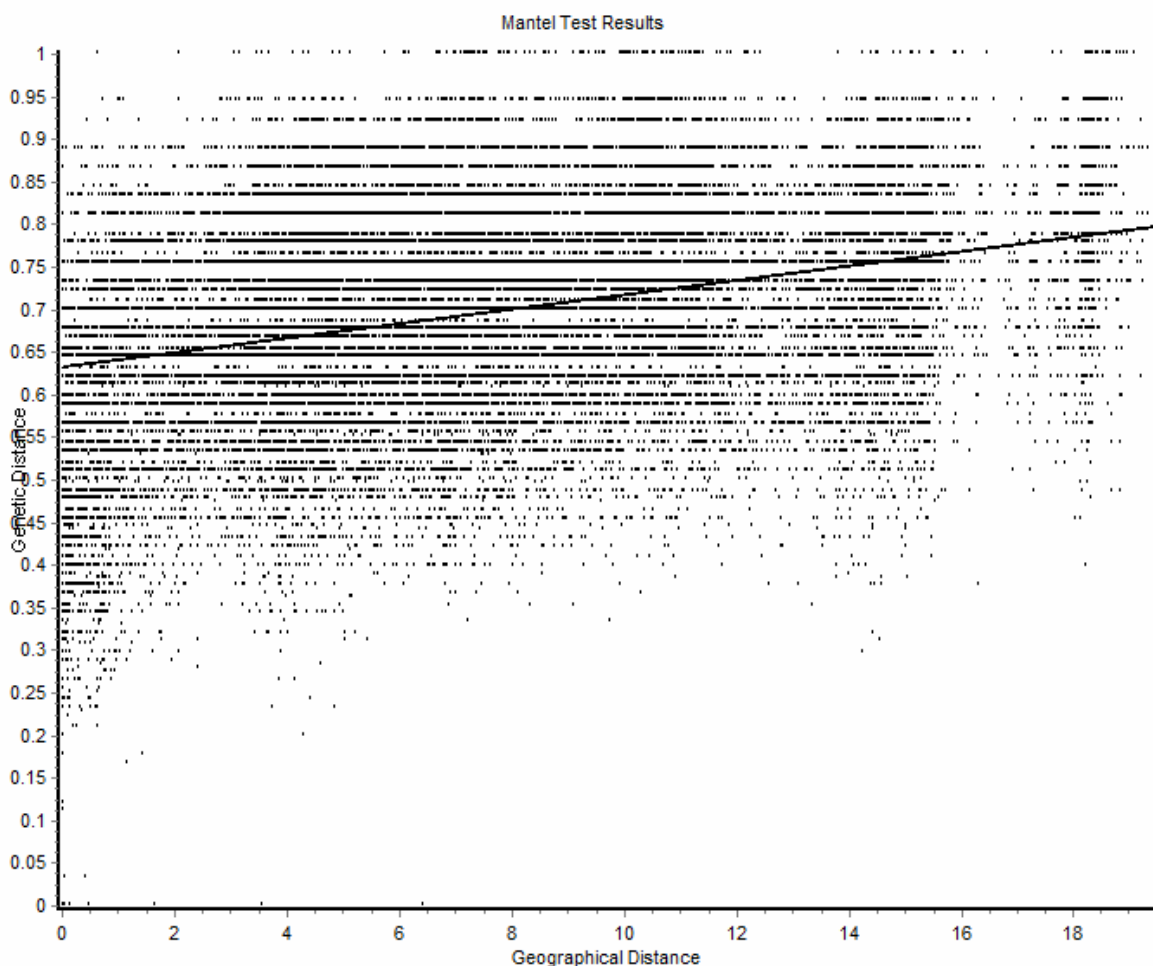
Obr. č. 14. Zobrazení tří subpopulací (světlou barvou), linie a odstupňování barev vyjadřují hodnotu posteriorní pravděpodobnosti příslušnosti individuů do subpopulace, body reprezentují jednotlivá individua, jako poslední je vložena mapa studovaného regionu.

3.6.2. Alleles In Space

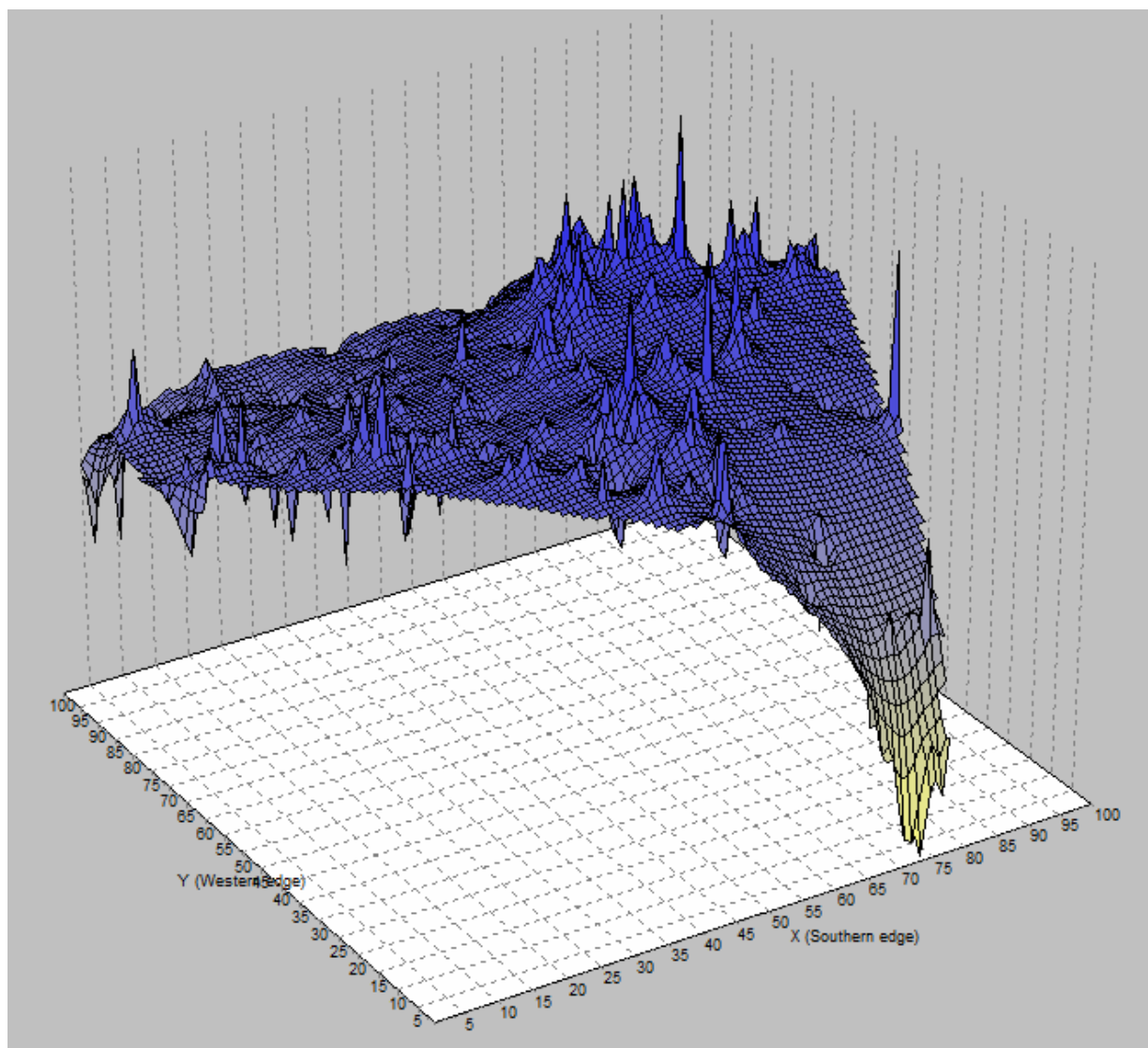
V programu Alleles In Space byl proveden Mantelův test, zobrazující korelaci mezi genetickou a geografickou vzdáleností jedinců (Obr. č. 15). Analýza byla signifikantní ($r = 0,303$, $p < 0,001$), indikující závislost mezi těmito dvěma faktory (isolation-by-distance).

Výsledkem Genetic landscape shape analýzy jsou obrázky 16. - 18., které zobrazují různá natočení výsledného zobrazení genetické distance mezi jedinci (osa z) v prostoru. Prostor je reprezentován osami x a y, které korespondují se zeměpisnými souřadnicemi v rámci použité sítě (100x100) s jednotkou cca 15 km. Malá genetická distance mezi jedinci je patrná pro oblast Kréty a České republiky, naopak velké distance mezi individui se nacházejí v oblasti jižní a

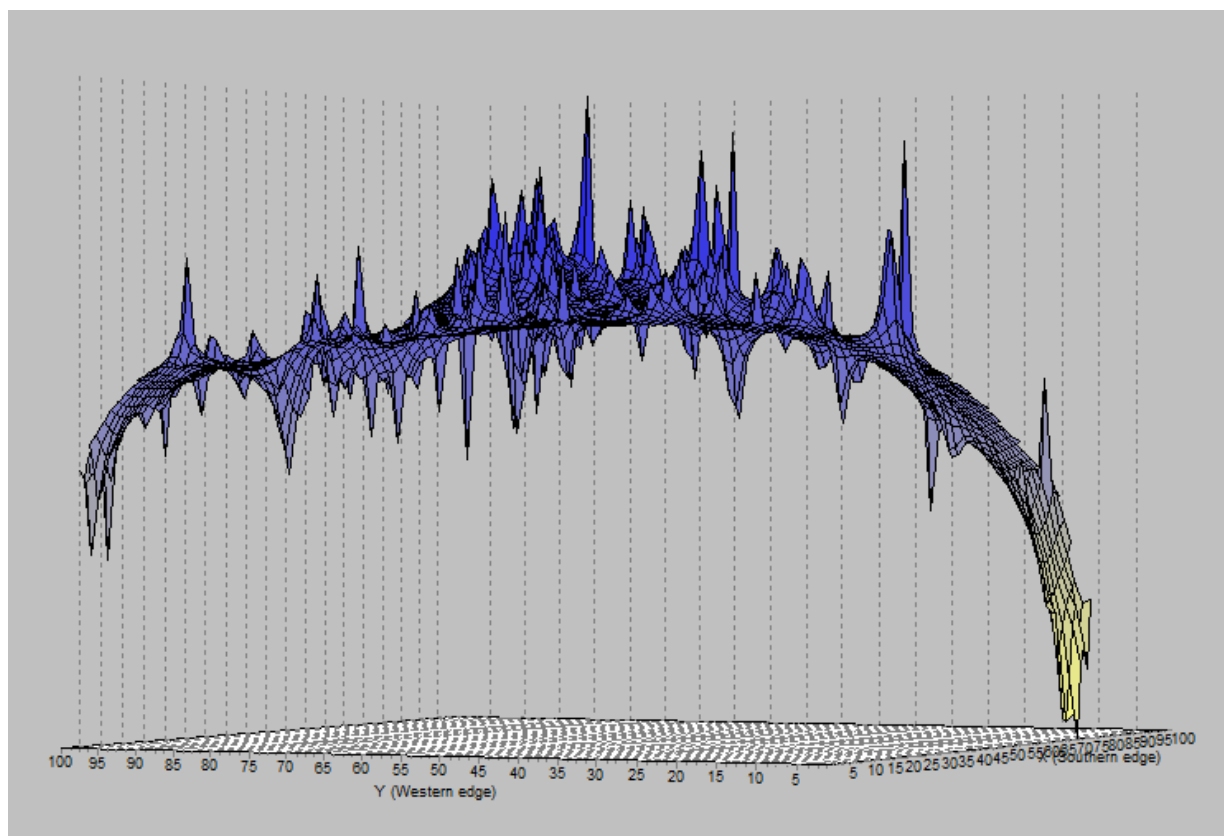
východní části Balkánského poloostrova, s největší distancí v oblasti Rumunska (Obr. č. 16 - 18).



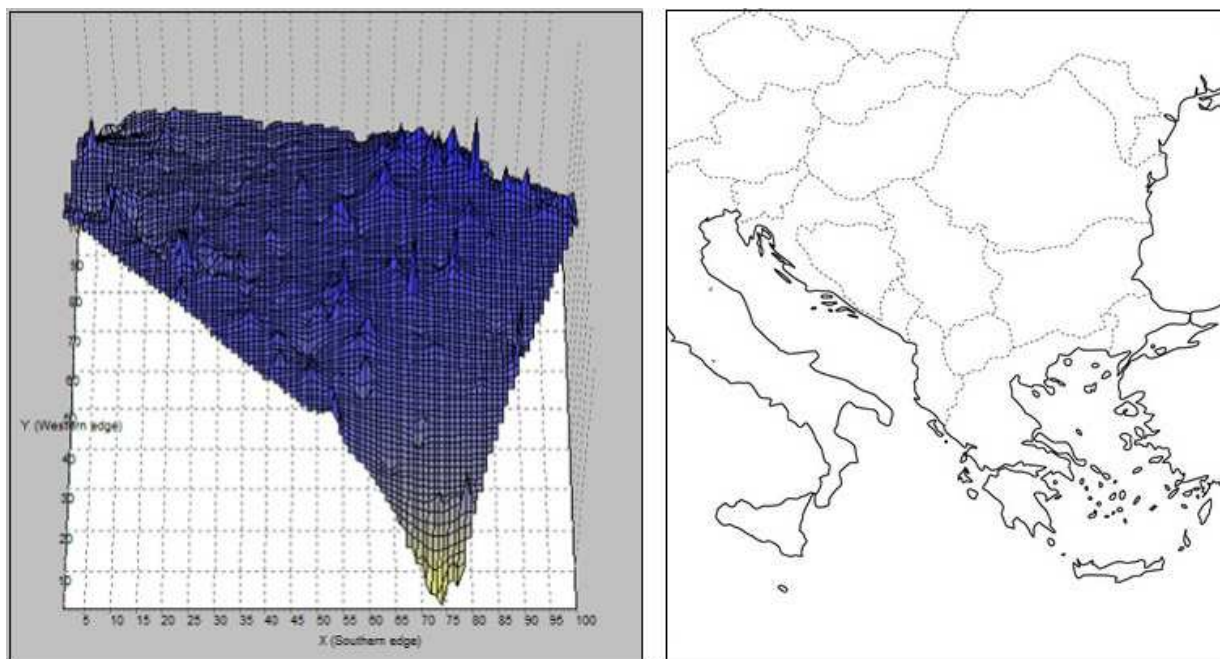
Obr. č. 15. Zobrazení výsledku Mantel testu (Mantel 1967), neboli korelace mezi genetickou a geografickou vzdáleností jedinců. osa x znázorňuje geografické distance, osa y genetické distance. Daty je proložena lineárně-regresní přímka; $r = 0,303$, $p < 0,001$.



Obr. č. 16. Zobrazení Genetic landscape shape analýzy. Osy x a y korespondují se zeměpisnými souřadnicemi v rámci použité sítě (100x100) s jednotkou cca 15 km, osa z vyjadřuje genetickou distanci testovaných jedinců. Vrcholy představují oblasti, kde genetické distance jsou nadprůměrné a mohou proto korelovat s oblastmi bariér genového toku, údolí reprezentují oblasti s podprůměrnými genetickými distancemi. Je patrný největší propad v oblasti Kréty (pravá část obrázku), další v oblasti České republiky (levá část). Naopak největší genetické distance vykazuje populace původem z Rumunska a jihu Balkánského poloostrova.



Obr. č. 17. Zobrazení Genetic landscape shape analýzy. Osy x a y korespondují se zeměpisnými souřadnicemi v rámci použité sítě (100x100) s jednotkou cca 15 km, osa z vyjadřuje genetickou distanci testovaných jedinců. Vrcholy představují oblasti, kde genetické distance jsou nadprůměrné a mohou proto korelovat s oblastmi bariér genového toku, údolí reprezentují oblasti s podprůměrnými genetickými distancemi. Je patrný největší propad v oblasti Kréty (pravá část obrázku), další v oblasti České republiky (levá část). Naopak největší genetické distance vykazuje populace původem z Rumunska a jihu Balkánského poloostrova.



Obr. č. 18. Zobrazení Genetic landscape shape analýzy. Osa x zobrazuje zeměpisnou délku, osa y zeměpisnou šířku, osa z genetickou distancí testovaných jedinců. Při tomto natočení 3D grafu je přibližně patrný rozsah a tvar studovaného areálu v porovnání s m

4. Diskuze

4.1. Charakteristika studie

Tato genetická studie byla zaměřená na identifikaci možné strukturovanosti balkánského refugia v souvislosti s novým konceptem pojmání glaciálních refugií, tzv. konceptem „refugia - within - refugia“ (Gómez & Lunt 2006), s využitím druhu *Erinaceus roumanicus* jako modelového organismu. Tento koncept mění předchozí paradigma vnímající evropské poloostrovy v období glaciálů jako prostorově a klimaticky homogenní krajinu; naopak podporuje přítomnost množství subcenter uvnitř každého ze tří poloostrovů, sloužících jako refugia pro různé druhy živočichů a rostlin, jak bylo pomocí literární revize ukázáno na příkladě Iberského poloostrova (Gómez & Lunt 2006).

Současně tato práce navazuje na předchozí výzkum genetické variability ježků rodu *Erinaceus* v zóně jejich sympatrického výskytu na území střední Evropy (Bolfíková & Hulva 2012). Zahrnutím jedinců druhu *E. roumanicus* původem z této geografické oblasti do analýz, tato práce přispívá k pochopení evolučních mechanismů, probíhajících v oblasti sekundárního kontaktu obou druhů.

S využitím přístupu tzv. krajinné genetiky (Manel et al. 2003) a programů Geneland a Alleles In Space, jsme byli schopni detekovat genetické diskontinuity v populaci a korelovat tyto diskontinuity s lokálními charakteristikami prostředí. Na základě tohoto přístupu lze vytvářet hypotézy ohledně fylogeografie studovaného organismu, např. identifikovat bariéry, které brání nebo v minulosti bránily genovému toku mezi subpopulacemi, a jeho ekologie, např. při odlišné distribuci ekotypů. Přínosem programů, využívajícím přístup krajinné genetiky, je především to, že základem analýzy je jedinec a populace tudíž nemusí být definovány *a priori*. Tento relativně nový přístup by do budoucna mohl umožnit pochopení toho, jak geografické a environmentální faktory ovlivňují genetickou variabilitu jedinců i populací a má využití také v ochranářské biologii (Manel 2003).

Shromážděný dataset zahrnoval gradient genotypů pokrývající areál výskytu druhu od severozápadu po jihovýchod, včetně ostrovních populací. To nám umožnilo vzájemně srovnat jedince za a) z oblastí s kontinuálním výskytem druhu, zahrnujících lokality glaciálních refugií, b) z oblastí osídlených v období postglaciální expanze včetně c) oblastí sekundárního kontaktu s druhem *E. europaeus*, d) z ostrovní populace.

4.2. Oblasti kontinuálního výskytu druhu a refugiální populace

Při nejvíce podpořeném rozdělení datasetu programem Structure a Geneland na tři populace, Kréta a Česká republika tvořily samostatné populace a ostatní jedinci tvořili třetí. Při tomto rozlišení se ohledně substruktury Balkánského poloostrova nedá vyvodit žádný závěr.

Druhým nejvíce pravděpodobným se ukázalo být rozdělení na sedm populací a při tomto rozdělení datasetu je již patrná substruktura tvořená individui z jednotlivých států a geografický gradient jdoucí od severozápadu po jihovýchod, který tvoří.

V rámci Balkánského poloostrova, který tvoří oblast kontinuálního výskytu druhu, nejvíce odlišná se jeví populace původem ze Slovinska, která je geneticky vzdálená i geograficky blízké chorvatské populaci. Chorvatsko vytváří klastr společně s Bosnou a Hercegovinou. Poslední populaci, jasně vymezenou oproti geograficky blízké krétské populaci, tvoří jedinci ze Srbska, Srbska-Vojvodiny, Černé hory, Bulharska, Makedonie a Řecka.

Oddělení slovinské populace by mohlo být důsledkem geografické izolace v refugiu, neboť v oblasti Slovinska byl přítomen les i v průběhu posledního glaciálního maxima (Tzedakis 2004). Další možností je, že je tato populace ovlivněná sekundárním kontaktem s druhem *E. europeus*, jak bude diskutováno dále.

Izolace v subrefugiu by mohla vysvětlovat i genetický status populace z Chorvatska a Bosny a Hercegoviny, kde vzhledem k blízkému pobřeží a hornaté krajině mohl být dostatek srážek, schopných udržet lesnatou vegetaci (obzvláště pokud existovala v nedalekém Slovinsku).

Podle výsledků programu Alleles In Space se největší genetické distance našeho datasetu nalézají v oblasti Rumunska, zároveň program Structure vyhodnotil rumunskou subpopulaci jako samostatnou. Vysoké hodnoty genetických distancí mezi individui jsou charakteristické v případě omezeného genového toku, typicky v přítomnosti geografické bariéry, v případě rumunské populace reprezentované pohořím Karpat.

Pobřeží Černého moře je pravděpodobným subrefugiem v rámci Balkánského poloostrova (Schmitt 2007), jak bylo zjištěno např. pro druhy *Bombina bombina* (Fijarczyk et al. 2011) a *Emys orbicularis* (Joger et al. 2007), a je zde doložená existence stromů během LGM (Tzedakis 2004). Je tedy pravděpodobné, že tato oblast sloužila jako subrefugium i druhu *E. roumanicus*, s čímž může souviset unikátnost rumunské populace a místní genetická a morfologická variabilita.

Individua původem z Bulharska se liší od rumunské subpopulace, nicméně je nutné vzít v úvahu, že vzorky byly původem z Rumunska geograficky vzdálené části Bulharska a chyběl materiál z oblasti bulharského pobřeží Černého moře. Podle zobrazení genetických distancí programem Alleles In Space je tato oblast jihovýchodní části Balkánského poloostrova (Bulharsko, Řecko) po Rumunsku typická nejvyššími hodnotami genetických distancí mezi vzorky.

4.3. Oblasti osídlené během postglaciální expanze

Z oblastí jednotlivých balkánských subrefugií docházelo následně k expanzi *E. roumanicus* severním směrem až po dosažení dnešních hranic rozšíření. Tato expanze probíhá i nadále minimálně na území České republiky, kdy byl zaznamenán posun hranic areálu rozšíření od sedmdesátých let po současnost směrem na západ (Bolfíková & Hulva 2012).

Expanze druhu z refugia je často doprovázena tzv. efektem hrdla láhve (Bottleneck effect) následujícím po drastické redukci početnosti populace a způsobujícím redukcí původního polymorfismu. Předpokládá se proto, že populace v později osídlených částech areálů budou vykazovat sníženou genetickou diverzitu oproti refugiálním populacím, které zde dlouhodobě přetrvávají a mají čas akumulovat genetickou variabilitu (Hewitt 1996).

V našem datasetu jsou tyto postglaciálně osídlené oblasti reprezentované jedinci z Čech, Slovenska, Maďarska a pravděpodobně také z některých částí Rumunska. Podle výsledků programu Alleles In Space se zdá, že v těchto oblastech (s výjimkou Rumunska, kde předpokládáme přítomnost refugiální populace při pobřeží Černého moře) opravdu dochází k poklesu alelické diverzity.

Populace původem ze Slovenska a Maďarska tvoří klastr odlišný od populace z Čech, ale tvořící kontinuální přechod mezi ní a rumunskou subpopulací.

4.4. Oblasti sekundárního kontaktu s druhem *E. europeus*

Populace z České republiky je značně odlišná od zbytku datasetu, což potvrdily shodně všechny analýzy stejně jako v případě krétské populace. Hodnoty F_{ST} mezi Českou republikou a ostatními populacemi včetně slovenské, dosahovali hodnot 0,0789, což je v mezích střední diference.

Na území České republiky se nachází sekundární kontaktní zóna dvou druhů ježků rodu *Erinaceus* - *E. roumanicus* a *E. europeus*. K utvoření této zóny došlo pravděpodobně

během neolitického odlesňování krajiny po skončení poslední doby ledové (Bolfíková & Hulva 2012). Příbuzné druhy žijící v sympatrii na určitém území podléhají specifickým evolučním mechanismům, jako je fenotypový sympatrický posun znaků, popř. mezidruhovému křížení, pokud nejsou utvořeny reprodukčně - izolační bariéry.

Ačkoliv v současnosti na našem území zřejmě nedochází k hybridizaci mezi oběma druhy, popř. je velmi nízká (Bolfíková & Hulva 2012), v později utvořené ruské části kontaktní zóny byl zaznamenán výskyt hybridních jedinců (Bogdanov et al. 2009).

Fenotypový posun znaků je jev, vyskytující se v případě sympatrického výskytu ekologicky si podobných druhů (jako je tomu v případě ježků rodu *Erinaceus*). U populací těchto druhů dochází v rámci omezení mezidruhovému kompetice k rozdělení ekologické niky, k čemuž jim dopomáhá fenotypová plasticita. Populace ekologicky si podobných druhů, žijících v zóně sympatrie, tak jeví tendence navzájem se od sebe odlišit a tyto změny mohou zahrnovat fenotypové, behaviorální, ekologické a/nebo fyziologické adaptace (Brown & Wilson 1956).

Morfometrická studie zaměřená na variabilitu ve velikosti a tvaru krania obou druhů ježků ze zóny sympatrie i alopatrie ovšem neprokázala fenotypový posun znaků v sympatrii. Populace obou druhů ze zóny sympatrie si naopak byli více podobné (zmenšení velikosti), než tomu bylo při srovnání alopatrických populací. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu by mohla být mezidruhovému hybridizace v minulosti nebo ekologické adaptace obou druhů (Knitlová et al. in prep.).

Zvláštní postavení české populace v našich datech by mohlo být následkem této minulé hybridizace, kdy došlo k prvnímu setkání obou druhů na území střední Evropy, a kdy ještě nebyly vyvinuty reprodukčně - izolační bariéry, zabráňující mezidruhovému křížení. Populace z České republiky při párovém F_{ST} vykazuje vyšší hodnoty (větší genetická vzdálenost) při srovnání s populací ze Slovinska (0,1303) a Chorvatska a Bosny a Hercegoviny (0,1124), než při srovnání s ostatními populacemi, včetně geograficky nepoměrně vzdálenější populace z jihu Balkánského poloostrova (0,0962). Zde by mohlo hrát roli pohoří Alp, sloužící jako bariéra toku genů mezi těmito subpopulacemi.

Populace ze Slovinska se nachází, stejně jako česká populace, v sekundární kontaktní zóně s druhem *E. europaeus*. Je možné, že zde také probíhají procesy, u kterých předpokládáme, že hrají roli v diferenciaci české populace. Přestože tyto procesy nebudou zřejmě tolik intenzivní jako je tomu v případě České republiky, neboť kontakt obou druhů na území Slovinska je limitován přítomností Alp, zahrnují, stejně jako v případě české populace, možný posun znaků a v minulosti proběhlou hybridizaci. Vysvětlením rozdílnosti slovinské a

české populace by proto mohly být tyto evoluční procesy probíhající odlišně na různých místech kontaktní zóny.

4.5. Ostrovní populace

Analýza našich dat podpořila genetickou unikátnost krétské populace, což dobře koresponduje s pojmáním této populace jako samostatného poddruhu *E.r. nesiotés*, popsaného Dorothou Bate v roce 1906.

Všechny použité programy (AFC, Structure, Geneland, Alelles-In-Space) jasně oddělily krétskou populaci od zbytku datasetu. Párové distance (F_{ST}) dosahovaly vysokých hodnot, značících genetickou diferenciaci, jak při srovnání krétské a české populace (0,2889), tak při srovnání s populací z Balkánského poloostrova (0,1804).

Evoluce ostrovních populací je ovlivněna více faktory, mezi nejdůležitější patří velikost ostrova, jeho vzdálenost od pevniny, fyzická členitost, složení fauny a flóry a obtížnost s jakou je umožněna další disperze na ostrov (van der Geer et al. 2010). Mimo tyto fyzikální faktory se zde projevují také specifické evoluční mechanismy prvně popsané již Ernstem Meyerem (1942), související s přenosem pouze částečného polymorfismu ze zdrojové populace, reprezentované často pouze několika jedinci kolonizujícími ostrov (a tím značným omezením genetické variability). Tento jev je znám jako efekt zakladatele (Founder effect).

V takto ovlivněných ostrovních populacích následně dochází k dalším jevům, jako je inbrední křížení a především genetický drift, projevující se výrazně v malých populacích a způsobující náhodné posuny ve frekvenci alel, končící v některých případech až fixací daných alel a tudíž další ztrátou genetické diverzity. Všechny tyto procesy mohly mít vliv na evoluci krétské subpopulace ježků a způsobily její značnou odlišnost ve srovnání s pevninskou populací.

Kréta, obklopená hlubokým mořem, nebyla spojena s řeckou pevninou od dob Mesinské salinitní krize před 5 miliony lety, i přes značné kolísání hladiny moře během glaciálních cyklů (Schule 1993). Je tedy téměř jisté, že ježci byli na Krétu introdukováni lidmi, pro což hovoří i archeologický záznam (Jarman 1996).

Ježci byli na Krétu dovezeni pravděpodobně v mínojské době cca před 3 - 2 tisíci lety př. n. l. a teprve od té doby jsou součástí krétské fauny (Jarman 1996). Při následující populační expanzi zde zřejmě hrály roli výše popsané demografické procesy, charakteristické pro vývoj ostrovních populací (genetický drift, efekt zakladatele, inbreeding). Tyto procesy

urychlující evoluci ostrovních populací jsou ovšem zpomalovány, popř. úplně neutralizovány, pokud pravidelně dochází k další imigraci jedinců ze zdrojové populace. V případě krétských ježků *E. roumanicus* tedy nemohla být následná lidmi zapříčiněná imigrace dalších jedinců z pevniny natolik vysoká, aby převážila tyto procesy.

Nepublikovaná genetická data z kontrolní oblasti mitochondriálního úseku DNA (Černá Bolfíková nepubl. data), které ukazují pouze na mělkou divergenci (cca 1%) mezi Krétou a ostatními sekvencemi, jsou ve shodě s předpokladem relativně recentní kolonizace Kréty, jak dokládají archeologické nálezy. Procesy, které se odehrávají v této ostrovní populaci nejsou tedy příliš staré a jsou detekovatelné pouze rychle mutujícími markery, jakými jsou např. zvolené mikrosatelity .

Dva jedinci původem z Peloponéskeho poloostrova klastrovali společně s krétskou populací. Tento fenomén je možné interpretovat tak, že peloponéská populace je zdrojovou populací, odkud došlo k importu ježků na Krétu (což je k vzhledem k nevelké geografické vzdálenosti pravděpodobné). Druhou variantou je import opačným směrem, tedy z Kréty na řeckou pevninu.

Existuje zde také možnost, že populace ježků z Kréty je odlišná právě následkem toho, že importovaní jedinci pocházeli z Peloponéskeho poloostrova, který je částečně izolován od zbytku řecké pevniny. Významnost této oblasti byla podpořena nedávnou molekulárně - genetickou studií, která povýšila peloponéskeho slepýše rodu *Anguis* na samostatný druh *A. cephallonica* (Gvoždík et al. 2010). Dalším příkladem mohou být plži rodu *Codringtonia*; v rámci tohoto rodu existují čtyři druhy endemické pro Peloponéský poloostrov (Kotsakiozi et al. 2012).

4.6. Poddruhy Balkánského poloostrova

Z množství popsáných poddruhů *E. roumanicus* popsáných v rámci Balkánského poloostrova jsme potvrdili výskyt poddruhu *E. roumanicus nesiotis* z Kréty.

Status ostatních poddruhů je nejasný, především protože zde neexistuje jednotný názor na rozšíření těchto poddruhů. V našich genetických datech jsme nenalezli podporu pro názor Giagia & Markakis (1996) ohledně rozšíření poddruhu *E.r. bolkayi* v jižní části Balkánu, ani pro názor autorů Đulić & Mirić (1967), kteří popisují rozšíření poddruhu na území Slovinska, Chorvatska, Bosny a Hercegoviny a Černé Hory.

E.r. drozdovskii, charakteristický prodlouženou lebku a menší kapacitou mozkovny (Holz 1978), jehož výskyt byl popsán Kratochvílem (1980) z oblasti Rumunska a Bulharska,

by mohl reflektovat odlišnost rumunské populace v našich datech, nicméně typová lokalita tohoto poddruhu leží v Makedonii (viz. Úvod). Poslední poddruh balkánské oblasti, *E.r. danubicus*, je taktéž popsán z oblasti Rumunska a mohl by být podpořen našimi výsledky jako relevantní.

Na základě našich genetických dat a dle množství popsaných morfotypů v rumunské oblasti je zřejmé, že místní populace zasluhuje detailnější revizi.

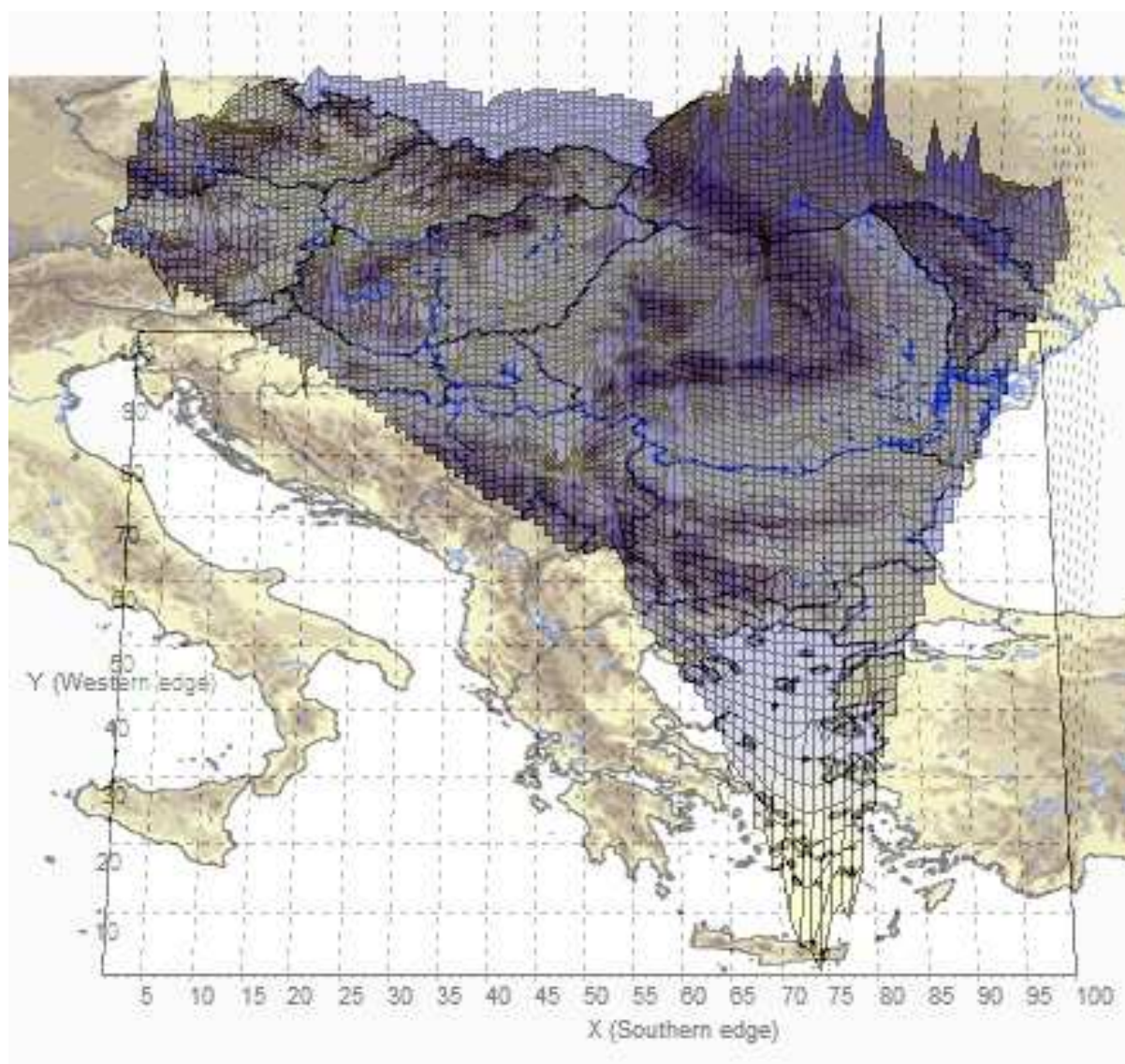
4.7. Distribuce genetické variability

Prostorová distribuce genetické variability je ovlivněna ekologickými a historickými faktory. Mezi ekologické faktory patří ekologické preference druhu pro určité prostředí a také jeho schopnost přizpůsobit se dostupnému prostředí. Je nutné vzít v úvahu, že klimatické podmínky během glaciálů byly velmi variabilní v čase i prostoru a spíše než o přítomnost lesa šlo o celkově mírnější mikroklimatické podmínky, navíc výskyt stromů v období LGM nemusel znamenat zapojený les (Tzedakis 2004). Faktem je, že ekologické preference ježků v období glaciálů nejsou známy (v detailech není známa ani jejich současná habitatová preference). Limitujícími faktory pro tento druh, tedy poměrně malého hmyzožravého savce s rychlým metabolismem, jsou teplota, z biotických faktorů potom přítomnost potravních zdrojů, tedy bezobratlých živočichů a drobných obratlovců. Je zřejmé, že vliv pleistocenních oscilací na fenologii těchto skupin byl komplikovaný. V případě ježků *E. roumanicus* výše uvedené úvahy ohledně možných balkánských subrefugií často vycházejí z předpokladu určité ekologické vazby ježků na lesnatou vegetaci, popř. oblasti s vyšším množstvím srážek, přestože druh v současnosti preferuje spíše otevřenější habitaty. V současnosti jsou tyto habitaty představovány hlavně kulturní stepí a parkovou krajinou.

Předpokládáme tedy distribuci druhu v období glaciálů nikoliv v oblastech přímo zapojeného lesa, ale spíše na okraji těchto habitatů, v oblastech, kde převládala lesostep. Při řešení této otázky by do budoucna mohlo pomoci modelování ekologické niky druhu a to jak pro objasnění současné mikrohabitatové preference, tak v návaznosti na lokalizaci subrefugií v rámci Balkánu během pleistocénu.

Co se týče historických faktorů ovlivňujících prostorovou distribuci genetické variability, je v případě ježků důležitým faktorem schopnost disperze. Použití programů, založených na principu Isolation-by-distance, jako je v tomto případě Alleles In Space umožňuje detekci genetických diskontinuit a při srovnání s pozicí geografických bariér lze vytvářet hypotézy ohledně bariér toku genů, které hrají roli v distribuci druhu. V případě

ježků *E. roumanicus*, obývajících převážně nižší polohy do 300 m. n. m. (Bolfíková & Hulva 2012), jsou bariéry tvořeny nejčastěji pohořím, která omezují migrační schopnosti druhu. To je dobře pozorovatelné v případě geneticky distantní populace původem z centrálního Rumunska, kde bariéru tvoří Karpaty, jak je vidět na Obr. č. 19., a také v případě genetické vzdálenosti slovinské populace od české, kde bariéru toku genů tvoří Alpy. Větší genetické distance mezi jedinci, zobrazené v Alleles In Space, jsou patrné také podél dalších horských systémů v oblasti Bulharska, Makedonie a Řecka a podél Dinárského pohoří. Dále by kromě pohoří a vodních těles mohly hrát roli velké řeky (jako je v tomto případě Dunaj) a také okolní distribuce habitatů, kterými se druh může dále šířit.



Obr. č. 19. Srovnání topografické mapy s vyznačenými velkými vodními toky vytvořené v GIS s mapou genetických distancí vytvořenou pomocí Alleles In Space. Největší genetické distance mezi jedinci jsou patrné v oblasti Karpat, které zřejmě slouží jako bariéra toku genů. Vyvýšeniny značící genetické distance jsou nicméně patrné i podél dalších pohoří Balkánu.

4.8. Závěr

Pomocí reprezentativního vzorkování a molekulárních dat zpracovaných postupy populační a krajinné genetiky jsme byli schopni popsat prostorovou distribuci genetické variability ježka východního (*E. roumanicus*) v rámci Balkánského poloostrova a střední Evropy. Tato část areálu je klíčová pro pochopení vlivu pleistocenních oscilací klimatu na genetickou architekturu a speciaci této linie. Nejvíce geneticky distantní se ukázala být krétská populace, jejíž odlišnost je zapříčiněna mechanismy ostrovní evoluce. Taktéž unikátní je populace z České republiky, kde hrají roli mezidruhové interakce a možná introgrese. Další identifikované subpopulace pocházely z oblasti Slovenska a Maďarska, Slovinska, Chorvatska a Bosny a Hercegoviny, Rumunska a jihu Balkánského poloostrova.

Na základě analýzy Alleles In Space bylo možné formulovat hypotézy ohledně bariér toku genů v rámci zkoumaného území. Největší genetické distance mezi jedinci, související pravděpodobně s přítomností Karpat, byly nalezeny v oblasti Rumunska, kde se mohlo nacházet glaciální subrefugium druhu, a dále na jihu Balkánského poloostrova.

Za účelem revize popsaných poddruhů a potvrzení přítomnosti glaciálního refugia v této oblasti by bylo nicméně potřebné získat další genetický materiál z oblasti Rumunska a bulharského pobřeží Černého moře. Taktéž v případě identifikace původu krétské populace by bylo zapotřebí získat další materiál z oblasti Peloponéskeho poloostrova.

Mikrosatelitová data zvolená v této studii se ukázala jako vhodný marker, neboť byla schopná detekovat i relativně recentní populační jevy, které nedokázala dobře zachytit pomaleji se vyvíjející mitochondriální DNA (přestože šlo o rychle mutující kontrolní oblast), jak se ukázalo v případě krétské populace.

Ohledně habitatové preference ježků v obdobích glaciálů (a tím i lokalizaci glaciálních subrefugií) by do budoucna mohlo být přínosné modelování ekologické niky.

5. Literatura

Adams, J. M. (1997). Global land environments since the last interglacial. Oak Ridge National Laboratory, TN, USA. <http://www.esd.ornl.gov/ern/qen/nerc.html>

Anděra, M. & Gaisler, J. (2012). Savci České republiky. Academia, Praha. 288 pp.

Bannikova, A. A., Lebedev, V. S., Abramov A. V., Rozhnov V. V. (2014). Contrasting evolutionary history of hedgehogs and gymnures (Mammalia: Erinaceomorpha) as inferred from a multigene study. *Biological Journal of the Linnean Society*, 112(3), 499–519.

Becher, S. A. & Griffiths, R. (1998). Genetic differentiation among local populations of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) in mosaic habitats. *Molecular Ecology*, 7(11), 1599–1604.

Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F., (2004): Logiciel sous Windows (tm) pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS UMR. 5000. Université de Montpellier II, Montpellier.

Bennett, K. D., Tzedakis, P. C., Willis, K. J. (1991). Quarternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography*, 18(1), 103–115.

Berggren, K.T., Ellegren, H., Hewitt, G.M., Seddon, J.M. (2005). Understanding the phylogeographic patterns of European hedgehogs, *Erinaceus concolor* and *E. europaeus* using the MHC. *Heredity*, 95(1), 84–90.

Blondel, J. (2009). The nature and origin of the vertebrate fauna, in Woodward, J. C. (ed.), *The Physical Geography of the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford, 139–163.

Bogdanov, A. S., Bannikova, A. A., Pirusskii, Yu. M., Formozov, N. A. (2009). The first genetic evidence of hybridization between West European and Northern White-breasted hedgehogs (*Erinaceus europaeus* and *E. roumanicus*) in Moscow region. *Biology Bulletin*, 36 (6), 647–651.

Bolfíková, B. & Hulva, P. (2012). Microevolution of sympatry: landscape genetics of hedgehogs *Erinaceus europaeus* and *E. roumanicus* in Central Europe. *Heredity*, 108(3), 248–255.

Boyce, M. S. (1978). Climatic variability and body size variation in the muskrats (*Ondatra zibethicus*) of North America. *Oecologia*, 36(1), 1–19.

Brewer, S., Cheddadi, R., de Beaulieu, J.L., Reille, M. (2002). The spread of deciduous *Quercus* throughout Europe since the last glacial period. *Forest Ecology and Management*, 156(1), 27–48.

Brown, J. H. (1995). *Macroecology*. University of Chicago Press, Chicago. 269 pp.

Corbet, G. B. (1988). The family Erinaceidae: a synthesis of its taxonomy, phylogeny, ecology and zoogeography. *Mammal Society of the British Isles. Mammal review*, 18(3). 117–172.

Deffontaine, V., Libois, R., Kotlík, P., Sommer, R., Nieberding, C., Paradis, E., Searle, J.B., Michaux, J.R. (2004). Beyond the Mediterranean peninsulas: evidence of central European glacial refugia for a temperate forest mammal species, the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Molecular Ecology*, 14(6), 1727–1739.

de Lattin, G. (1967). *Grundriss der Zoogeographie*. Veb Gustav Fischer Verlag. 602 pp.

Đulić, B. & Mirić, Đ. (1967). *Catalogus faunae Jugoslaviae* 4, Mammalia. Slovinska akd. znanosti i umetnosti, Ljubljana, 45 pp.

Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.

Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.

Fijarczyk, A., Nadachowska, K., Hofman, S., Litvinchuk, S. N., Babik, W., Stuglik, M., Gollmann, G., Choleva, L., Cogălniceanu, D., Vukov, T., Džukić, G., Szymura, J. M. (2011). Nuclear and mitochondrial phylogeography of the European fire-bellied toads *Bombina bombina* and *Bombina variegata* supports their independent histories. *Molecular Ecology*, 20(16), 3381–3398.

Fritz, U., Guicking, D., Kami, H. G., Arakelyan, M., Auer, M., Ayaz, D., Ay, C. (2007). Mitochondrial phylogeography of European pond turtles *Emys orbicularis*, *Emys trinacris* - an update. *Amphibia-Reptilia*, 28(3), 418–426.

Giagia Athanasopoulou, E. B. & Markakis, G. (1996). Multivariate analysis of morphometric characters in the Eastern hedgehog *Erinaceus concolor* from Greece and adjacent areas. *Zeitschrift Fuer Saeugetierkunde*, 61(3), 129–139.

Giagia, E. B. & Ondrias J. C. (1980). Karyological analysis of eastern European hedgehog *Erinaceus concolor* (Mammalia, Insectivora) in Greece. *Mammalia*, 44(1), 59–72.

Gómez, A. & Lunt, D. H. (2006). Refugia within refugia: patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula, in Weiss, S. & Ferrand, N. (ed.) *Phylogeography in southern European refugia*. Springer, Amsterdam, 155–188.

Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485–486.

Guillot, G., Mortier, F., Estoup, A. (2005). GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 712–715.

Gvoždík, V., Jandzik, D., Lymberakis, P., Jablonski, D., Moravec, J. (2010). Slow worm, *Anguis fragilis* (Reptilia: Anguidae) as a species complex: Genetic structure reveals deep divergences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 55(2), 460–472.

Grant, P. R. (1998). *Evolution on islands*. Oxford University Press, Oxford. 348 pp.

He, K., Chen, J., Gould G. C., Yamaguchi, N., Ai, H., Wang, Y., Zhang Y., Jiang X. (2012). An Estimation of Erinaceidae Phylogeny: A Combined Analysis Approach. PLoS ONE, 7(6), 1–14.

Henderson, M., Becher, S.A., Doncaster, C.P., Maclean, N. (2000). Five new polymorphic microsatellite loci in the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*. Molecular Ecology, 9(11), 1949–1950.

Hewitt, G.M. (1996). Some genetic consequences of ice ages. Biological Journal of the Linnean Society, 58(3), 247–276.

Hewitt, G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405, 907–913.

Holz, H. (1978). Studien an europäischen Igel. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 16(2), 148–165.

Hsü, K. J., Montadert, L., Bernoulli, D., Bianca, C. M., Erickson, A., Garrison, R. E., Kidd, R. B., Mèlierés, F., Müller C., Wright, R. (1977). History of the Mediterranean salinity crisis. Nature 267, 399–403.

Hulva, P., Horáček, I., Strelkov, P.P., Benda, P. (2004). Molecular architecture of *Pipistrellus pipistrellus*/*Pipistrellus pygmaeus* complex (Chiroptera: *Vespertilionidae*): further cryptic species and Mediterranean origin of the divergence. Molecular Phylogenetics and Evolution, 32(3), 1023–1035.

Huntley, B. (1999). Climatic change and reconstruction. Quaternary Proceedings, 14(6), 513–520.

Huntley, B. & Birks, H. J. B. (1983). An atlas of past and present pollen maps for Europe: 0–13000 years ago. Cambridge University Press. 667 pp.

IUCN (2014). The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1.
<http://www.iucnredlist.org>.

Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806.

Jarman, M. R. (1996). Human influence in the development of the Cretan mammalian fauna, in Reese, D. S. (ed.) *Pleistocene and Holocene fauna of Crete and its first settlers*. Monograph in *World archeology* NO.28, Prehistoric Press, Madison, 211–229.

Joger, U., Fritz, U., Guicking, D., Kalyabina-Hauf, S., Nagy, Z. T., Wink, M. (2007). Phylogeography of western Palaearctic reptiles—Spatial and temporal speciation patterns. *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 246(4), 293–313.

King, R. A. & Ferris, C. (1998). Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa*. *Molecular Ecology*, 7(9), 1151–1161.

Knitlová, M. et al. in prep.

Kotsakiozi, P., Parmakelis, A., Giokas, S., Papanikolaou, I., Valakos, E.D. (2012). Mitochondrial phylogeny and biogeographic history of the Greek endemic land-snail genus *Codringtonia* Kobelt 1898 (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 62(2), 681–692.

Kratochvil, J. Der hirnmasse der mittel europäischen arten der gattung *Erinaceus* (Insectivora: Mammalia). *Folia zoologica* 29, 1 - 20.

Kryštufek, B. & Reed, J. M. (2004). Pattern and process in Balkan biodiversity—an overview, in Griffiths, H. I. (ed.) *Balkan biodiversity pattern and process in the European hotspot*. Springer Netherlands, 1–8.

Kryštufek, B., Tvrtković N., Paunović M., Özkan B. (2009). Size variation in the Northern white-breasted hedgehog *Erinaceus roumanicus*: latitudinal cline and the island rule. *Mammalia*, 73(4), 299–306.

- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G., Taberlet (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in ecology and evolution*, 18(4) 2003, 189–197.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2), 209–220.
- Markov, G. (1957). Die Insektenfressenden Säugetiere in Bulgarien. *Bălgarska akademija na naukite*, Sofie. 287 pp.
- Masetti, M. & Sarà, M. (2003). Non-volant terrestrial mammals on Mediterranean islands: Tilos (Dodecanese, Greece), a case study. *Bonner Zoologische Beiträge*, 51(4), 261–268.
- Mather, A. E. (2009). Tectonic setting and landscape development, in Woodward, J. C. (ed.), *The Physical Geography of the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford, 5–32.
- Mayer, E. (1942). *Systematics and the Origin of Species, from the viewpoint of a zoologist*. Harvard University Press, 334 pp.
- Michaux, J. R., Libois, R., Paradis, E., Filippucci, M. G. (2004). Phylogeographic history of the yellow-necked fieldmouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 32(3), 788–798.
- Miller, M. P. (2005). Alleles In Space (AIS): Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, 96(6), 722–724.
- Musilová, R., Zavadil, V., Marková, S., Kotlík, P. (2010). Relics of the Europe's warm past: phylogeography of the Aesculapian snake. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(3), 1245–1252.
- Niethammer, J. & Krapp, F. (ed.) (1990). *Handbuch der Säugetiere Europas*. AULA-Verlag. Wiesbaden, 523 pp.

Pinceel, J., Jordaens, K., Pfenninger, M., Backeljau, T. (2005). Rangewide phylogeography of a terrestrial slug in Europe: evidence for Alpine refugia and rapid colonization after the Pleistocene glaciations. *Molecular Ecology*, 14(4), 1133–1150.

Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. J. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959.

Reed, J. M., Kryštufek, B., Eastwood, W. J. (2004). The physical geography of the Balkans and nomenclature of place names, in Griffiths, H. I. (ed.) *Balkan biodiversity pattern and process in the European hotspot*. Springer Netherlands, 9–22.

Reeve, N. (1994). *Hedgehogs*, T. & A. D. Poyser, London. 313 pp.

Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology* 4, 137–138.

Rousset, F. (2008). GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106.

Salvi, D., Harris, D. J., Kaliontzopoulou, A., Carretero, M. A., Pinho, C. (2013). Persistence across Pleistocene ice ages in Mediterranean and extra-Mediterranean refugia: phylogeographic insights from the common wall lizard. *BMC Evolutionary Biology*, 13(147), 2–18.

Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N.J., Hewitt, G.M. (2001). DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology*, 10(9), 2187–2198.

Seddon, J. M., Santucci, F., Reeve, N., Hewitt, G. M. (2002). Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolutionary Biology*, 15(3), 463–467.

Schoenfeld, M. & Yom – Tov, Y. (1985). The biology of two species of hedgehogs, *Erinaceus europaeus concolor* and *Hemiechinus auritus aegyptius*, in Israel. *Mammalia*, 49(3), 339–356.

Schmitt, T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology*, 4(11), 1–13.

Schmitt, T., Habel, J.C., Zimmermann, M., Müller, P. (2006). Genetic differentiation of the marbled white butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology*, 15(7), 1889–1901.

Schmitt, T. & Varga Z. (2012). Extra-Mediterranean refugia: The rule and not the exception? *Frontiers in Zoology*, 9(22), 1–12.

Schule, W. (1993). Mammals, vegetation and the initial human settlement of the Mediterranean islands: A palaeoecological approach. *Journal of Biogeography*, 20(4), 399–411.

Sommer, R. S. (2007). When east met west: the sub-fossil footprints of the west European hedgehog and the northern white-breasted hedgehog during the Late Quaternary in Europe. *Journal of zoology*, 273(1), 82–89.

Sotiropoulos, K., Eleftherakos, K., Dzukić, G., Kalezić, M.L., Legakis, A., Polymeni, R.M. (2007). Phylogeny and biogeography of the alpine newt *Mesotriton alpestris* (Salamandridae, Caudata), inferred from mtDNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(1), 211–226.

Stewart, I. S. & Morhange, C. (2009). Coastal geomorphology and sea-level change, in Woodward, J. C. (ed.), *The physical geography of the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford, 385–413.

Tzedakis, P. C. (1993). Long-term tree populations in northwest Greece through multiple Quaternary climatic cycles. *Nature*, 364(6436), 437–440.

Tzedakis, P. C. (2004). The Balkans as prime glacial refugial territory of European temperate trees, in Griffiths, H. I. (ed.) *Balkan biodiversity pattern and process in the European hotspot*, Springer Netherlands, 49–68.

van der Geer, A., Lyras, G., de Vos, J., Dermitzakis, M. (2010). *Evolution of island mammals: adaptation and extinction of placental mammals on islands*. Wiley-Blackwell, Chichester. 479 pp.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538.

Veith, M., Kosuch, J., Vences, M. (2003). Climatic oscillations triggered post-Messinian speciation of Western Palearctic brown frogs (Amphibia, Ranidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(2), 310–327.

Woodward, J.,(ed.) (2009). *The physical geography of the Mediterranean*. Oxford University Press, Oxford Regional Environments Series, Oxford. 663 pp

Příloha

Appendix 1. Odhadnutá frekvence nulových alel provedená programem Micro-checker pro jednotlivé subpopulace.

Česká republika (K = 3)					
Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	yes	0,1086	0,1367	0,0868	0,0868
Lok EEU6	yes	0,071	0,0792	0,0647	0,0647
LokEEU43H	no	0,0559	0,0575	0,0489	0,1002
Lok EEU54H	yes	0,087	0,1004	0,076	0,1304
Lok EEU12H	no	0	0	0	0
LokEEU4	yes	0,1087	0,1292	0,0993	0,0993
Lok EEU3	no	0,0369	0,0412	0,0275	0,0275
Lok EEU37H	no	0,038	0,0381	0,0292	0,0292
Lok EEU2	no	0,0229	0,0231	0,0208	0,0742

Balkán, Rumunsko, Slovensko, Maďarsko (K = 3)					
Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	yes	0,0663	0,0707	0,0619	0,0619
Lok EEU6	yes	0,0484	0,0503	0,0439	0,0439
LokEEU43H	yes	0,0851	0,0931	0,0792	0,1243
Lok EEU54H	yes	0,0969	0,1089	0,0785	0,2402
Lok EEU12H	yes	0,0752	0,1052	0,0334	0,0801
LokEEU4	yes	0,0499	0,0547	0,0482	0,0756
Lok EEU3	yes	0,0924	0,1007	0,0863	0,1092
Lok EEU37H	yes	0,0792	0,0942	0,0736	0,1772
Lok EEU2	yes	0,0989	0,1134	0,0945	0,4031

Kréta (K = 3)					
Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	no	-0,0493	-0,0381	-0,0336	0
Lok EEU6	no	-0,2149	-0,0714	-0,0408	0
LokEEU43H	no	-0,0755	-0,0696	-0,0549	0
Lok EEU54H	no	0,1253	0,1326	0,0925	0,2565
Lok EEU12H	yes	0,2432	0,3809	0,1801	0,2711
LokEEU4	no	0,0385	0,0448	0,0303	0,0303
Lok EEU3	yes	0,2099	0,2734	0,1584	0,1584
Lok EEU37H	no	-0,023	-0,0115	-0,001	0,2813
Lok EEU2	no	0,1329	0,1564	0,1142	0,5858

Česká republika (K = 7)

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	yes	0,1086	0,1367	0,0868	0,0868
Lok EEU6	no	0,071	0,0792	0,0647	0,0647
LokEEU43H	no	0,0559	0,0575	0,0489	0,1002
Lok EEU54H	yes	0,087	0,1004	0,076	0,1304
Lok EEU12H	no	0	0	0	0
LokEEU4	yes	0,1087	0,1292	0,0993	0,0993
Lok EEU3	no	0,0369	0,0412	0,0275	0,0275
Lok EEU37H	no	0,038	0,0381	0,0292	0,0292
Lok EEU2	no	0,0229	0,0231	0,0208	0,0742

Slovinsko + Maďarsko (K = 7)

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	yes	0,0837	0,0928	0,0781	0,0781
Lok EEU6	no	0,085	0,0991	0,0775	0,0775
LokEEU43H	no	0,0233	0,0339	0,0287	0,1057
Lok EEU54H	no	0,0702	0,0717	0,0541	0,0541
Lok EEU12H	no	-0,0451	-0,0226	-0,0036	0
LokEEU4	yes	0,0759	0,0786	0,0674	0,0674
Lok EEU3	no	0,046	0,0435	0,0387	0,0387
Lok EEU37H	no	0,0096	0,0196	0,015	0,015
Lok EEU2	no	0,0102	0,0166	0,0147	0,0908

Rumunsko (K = 7)

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	no	-0,0451	-0,0387	-0,0374	0
Lok EEU6	no	-0,0045	-0,0006	-0,0006	0
LokEEU43H	yes	0,1118	0,1212	0,1012	0,2112
Lok EEU54H	yes	0,1427	0,181	0,1285	0,5134
Lok EEU12H	yes	0,2068	0,3304	0,1235	0,2204
LokEEU4	yes	0,0947	0,1058	0,0872	0,0872
Lok EEU3	yes	0,1186	0,1351	0,1061	0,1061
Lok EEU37H	yes	0,1754	0,2253	0,1518	0,3559
Lok EEU2	yes	0,1482	0,1595	0,1213	0,7416

Slovensko (K = 7)					
Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	no	0,0701	0,0818	0,0675	0,0675
Lok EEU6	no	0,0232	0,0215	0,0187	0,0187
LokEEU43H	no	0,0488	0,0522	0,0444	0,1087
Lok EEU54H	yes	0,1463	0,1985	0,092	0,2797
Lok EEU12H	no	-0,0823	-0,0411	-0,0109	0
LokEEU4	no	0,0314	0,0373	0,0312	0,0312
Lok EEU3	no	-0,0175	-0,017	-0,0158	0
Lok EEU37H	no	0,0691	0,0789	0,0652	0,2106
Lok EEU2	no	0,0606	0,0718	0,0599	0,3692

Chorvatsko + Bosna a Hercegovina (K = 7)					
Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	yes	0,0703	0,0756	0,0652	0,0652
Lok EEU6	no	0,0087	0,009	0,0084	0,0084
LokEEU43H	yes	0,1222	0,1344	0,107	0,107
Lok EEU54H	no	0,0134	0,0182	0,014	0,181
Lok EEU12H	no	-0,0355	-0,0178	-0,0023	0
LokEEU4	no	-0,0544	-0,0454	-0,043	0,0415
Lok EEU3	yes	0,119	0,1305	0,1059	0,1059
Lok EEU37H	no	0,0527	0,0566	0,0458	0,1098
Lok EEU2	yes	0,1393	0,163	0,1307	0,3879

Bulharsko, Řecko, Makedonie, Srbsko, Srbsko-Vojvodina, Černá Hora (K = 7)					
Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	no	0,0523	0,0539	0,0476	0,0476
Lok EEU6	no	0,039	0,0315	0,0267	0,0267
LokEEU43H	no	0,0279	0,0292	0,0266	0,0266
Lok EEU54H	no	0,0478	0,0442	0,0355	0,0355
Lok EEU12H	no	0,0029	0,0284	0,0154	0,0154
LokEEU4	no	0,0158	0,0162	0,0147	0,0768
Lok EEU3	yes	0,0933	0,1049	0,0892	0,1768
Lok EEU37H	no	0,0287	0,0483	0,0376	0,1113
Lok EEU2	no	0,0721	0,071	0,0591	0,3518

Kréta (K = 7)					
Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
Lok EEU5	no	-0,0493	-0,0381	-0,0336	0
Lok EEU6	no	-0,2149	-0,0714	-0,0408	0
LokEEU43H	no	-0,0755	-0,0696	-0,0549	0
Lok EEU54H	no	0,1253	0,1326	0,0925	0,2565
Lok EEU12H	yes	0,2432	0,3809	0,1801	0,2711
LokEEU4	no	0,0385	0,0448	0,0303	0,0303
Lok EEU3	yes	0,2099	0,2734	0,1584	0,1584
Lok EEU37H	no	-0,023	-0,0115	-0,001	0,2813
Lok EEU2	no	0,1329	0,1564	0,1142	0,5858

Appendix 2. Délky mikrosatelitových alel. Chybějící data jsou vyznačena nulou.

	EEU 5		EEU 6		EEU 43H		EEU 54H		EEU 12H		EEU 4		EEU 3		EEU 37H		EEU 2	
1	119	132	162	164	176	180	281	281	94	94	151	159	144	144	246	248	272	281
5	119	134	162	164	180	180	281	289	94	94	144	157	144	153	250	250	272	278
7	132	138	164	164	179	184	289	289	94	94	148	157	144	144	248	250	272	278
8	132	132	161	161	179	191	281	289	94	94	157	159	144	144	250	250	278	281
9	132	132	159	166	174	176	281	281	94	94	148	148	144	176	248	250	272	270
10	119	132	162	164	0	0	281	289	94	94	144	148	144	170	248	250	272	278
14	129	129	162	164	183	191	281	281	94	94	157	159	168	170	248	250	276	283
16	132	138	159	164	176	176	281	289	94	94	159	159	144	144	248	248	272	272
17	119	119	164	164	174	180	289	289	94	94	151	153	144	144	246	248	272	281
18	136	136	166	166	180	180	281	289	94	94	144	157	144	176	246	250	278	283
21	132	138	159	164	176	180	283	289	94	94	159	159	144	144	246	248	270	278
22	132	138	159	164	184	189	281	290	94	94	153	153	144	144	248	248	270	281
24	132	134	159	161	180	185	283	289	94	94	144	157	144	144	246	250	274	279
25	132	134	164	168	176	184	289	289	94	94	144	144	144	144	248	250	270	276
26	132	132	159	162	180	180	283	289	94	94	144	157	144	144	246	248	278	283
27	119	132	159	168	176	184	289	289	94	94	144	151	144	174	248	250	270	270
28	132	132	159	161	180	184	281	289	94	94	144	151	144	144	246	246	272	281
29	119	134	166	166	184	184	290	290	94	94	144	159	144	174	246	250	274	274
32	132	132	161	166	184	184	281	281	94	94	144	144	147	170	246	248	270	276
43	132	132	161	169	180	180	281	281	94	94	144	144	142	144	248	248	278	279
44	119	132	161	164	180	183	281	281	94	94	144	157	144	144	248	248	272	279
47	119	119	164	166	180	197	281	285	94	94	144	153	144	144	248	248	281	283
58	132	134	159	161	191	193	289	290	94	94	151	153	144	176	248	248	283	283
59	132	134	159	161	180	193	289	290	94	94	144	153	144	144	246	248	283	283
84	138	138	159	159	180	183	283	289	94	94	159	159	144	170	248	248	278	281
85	132	132	164	164	180	183	285	285	94	94	144	159	144	144	248	250	279	281
96	132	138	164	166	172	183	283	283	94	94	144	151	144	144	246	246	270	276
98	132	132	159	161	176	180	281	283	94	94	157	157	144	153	246	246	276	278
101	132	132	159	161	176	180	281	283	94	94	151	151	144	144	241	246	270	270
111	132	132	161	166	180	180	285	285	94	94	153	157	144	144	246	246	272	274
112	119	132	164	164	180	184	281	289	94	94	151	157	144	174	246	246	272	281
113	119	138	175	175	176	197	281	289	94	94	151	157	144	174	246	248	270	281
116	132	132	159	159	180	197	281	283	94	94	144	144	144	174	246	248	270	283

117	119	119	161	166	176	180	281	289	94	94	144	153	144	144	246	248	270	272
121	132	132	161	164	184	197	285	289	94	94	144	157	144	168	246	250	281	283
123	132	132	166	166	180	184	289	289	94	94	144	144	144	174	246	250	272	281
124	132	132	162	164	184	184	289	289	94	94	144	144	144	144	248	248	270	274
129	132	132	161	161	176	184	281	290	94	94	151	151	144	144	250	250	270	274
135	132	140	159	166	176	176	281	299	94	94	144	144	147	147	246	248	281	281
139	129	132	159	166	176	176	0	0	94	94	144	151	144	172	250	250	0	0
142	132	132	161	161	180	180	281	281	94	94	144	144	144	144	248	250	270	281
144	132	132	161	164	191	193	281	290	94	94	144	153	176	176	248	250	270	283
147	132	138	159	164	162	176	281	281	94	94	159	159	144	168	246	250	274	278
149	132	132	164	164	176	184	283	289	94	94	151	153	135	138	246	250	278	283
164	132	132	159	164	180	189	289	290	94	94	151	151	144	144	246	248	281	281
168	132	132	159	161	180	184	281	290	94	94	144	144	144	172	246	250	279	281
183	132	132	159	159	189	191	281	281	94	94	151	151	144	170	248	250	270	279
209	132	134	159	159	183	183	281	297	94	94	144	157	151	170	248	248	270	270
214	132	132	164	166	180	183	281	281	94	94	144	157	144	174	248	248	270	274
sk7	119	134	161	161	0	0	281	281	94	94	144	157	138	172	248	250	276	278
sk8	134	136	159	165	183	184	285	290	94	94	153	157	138	178	248	248	274	276
sk9	119	132	159	166	183	184	281	281	94	94	148	157	153	153	246	246	270	278
sk11	134	140	161	161	183	184	291	290	94	94	144	144	178	180	246	248	278	278
sk12	132	148	159	159	189	199	281	285	94	94	151	161	149	153	246	248	270	278
sk13	129	129	162	166	183	184	281	290	94	94	151	151	168	174	246	248	272	276
sk14	129	134	161	166	184	184	283	289	94	96	148	161	153	168	248	250	274	274
sk15	129	132	159	162	179	183	281	281	94	94	148	155	170	172	246	248	274	281
sk16	132	132	159	165	176	184	281	281	94	94	148	151	170	172	248	250	276	281
sk17	132	134	162	162	184	191	281	281	94	94	157	157	144	144	246	248	274	283
sk20	136	138	162	164	181	181	289	289	94	94	144	155	144	144	246	248	272	278
sk21	136	136	162	166	176	183	281	289	94	94	146	155	144	144	246	248	276	279
sk22	121	136	159	166	170	183	283	285	94	94	153	159	138	144	246	248	283	283
sk23	136	138	164	165	184	187	281	285	94	94	153	159	151	153	246	248	278	283
sk24	119	132	166	166	176	176	281	294	94	94	144	163	151	174	246	250	272	278
sk25	134	136	159	159	181	184	281	290	94	94	144	144	144	153	246	246	276	278
sk28	132	134	159	161	183	183	281	290	94	94	144	144	138	174	246	246	278	278
sk29	132	138	159	166	183	183	290	290	94	94	153	159	144	172	250	250	274	278

sk30	132	138	162	162	183	187	283	298	94	94	144	157	153	170	248	248	274	276
sk34	134	134	159	159	174	183	281	281	94	94	151	151	138	170	248	250	274	276
sk44	129	132	159	159	183	184	278	281	94	94	148	151	168	170	250	250	274	276
sk48	127	127	159	166	187	187	281	281	94	94	144	157	144	153	248	248	272	281
sk49	127	134	159	166	183	184	281	281	94	94	144	157	144	144	246	246	274	276
sk50	127	127	159	166	183	184	281	281	94	94	155	157	144	172	248	248	274	276
sk51	127	134	159	166	183	184	281	281	94	94	155	157	153	172	246	248	274	276
M10	136	136	159	159	184	184	281	283	94	94	144	144	144	168	250	250	272	272
M11	134	134	162	162	184	187	281	290	94	94	159	159	149	151	246	248	274	276
M12	129	138	159	161	176	178	281	283	94	94	159	161	153	153	248	250	246	287
M4	129	145	159	162	184	184	289	290	94	94	159	159	153	168	246	248	0	0
M5	129	134	159	159	180	187	283	283	94	96	155	163	168	170	246	246	272	276
M6	113	132	162	164	183	184	281	281	94	94	153	159	166	168	246	246	276	276
M7	113	134	161	161	162	183	281	292	94	94	159	163	153	170	248	250	276	283
M8	134	134	162	166	184	184	281	292	94	96	144	159	168	168	246	250	274	274
M9	129	129	159	166	178	183	281	285	94	94	157	159	168	170	246	248	276	278
RMN10	138	140	161	162	183	187	281	281	94	94	155	159	144	149	246	248	0	0
RMN11	127	136	159	161	176	180	281	285	94	94	144	155	149	151	239	246	272	279
RMN12	127	136	159	170	183	189	281	283	94	94	153	155	144	149	246	248	0	0
RMN13	136	138	153	161	176	183	285	285	94	94	159	174	149	168	248	248	267	268
RMN14	136	138	159	161	187	189	285	285	94	94	153	157	144	166	246	248	272	272
RMN15	127	138	159	162	0	0	0	0	94	100	153	155	144	172	239	239	0	0
RMN16	117	127	161	161	176	178	276	281	94	94	153	155	149	158	0	0	0	0
RMN17	134	143	159	166	180	180	281	285	94	94	153	155	151	151	246	248	263	274
RMN18	102	136	166	166	158	189	283	283	94	96	151	153	144	144	246	246	279	279
RMN19	123	134	159	162	176	189	281	283	94	94	153	153	151	151	248	248	0	0
RMN20	136	140	168	172	0	0	0	0	94	94	144	155	170	170	250	250	270	278
RMN21	136	140	162	174	183	183	283	283	94	94	157	161	149	160	250	250	272	276
RMN23	101	136	159	166	183	183	0	0	94	94	157	157	144	147	248	250	272	272
RMN24	138	140	159	161	187	189	281	285	94	94	151	151	144	144	248	248	276	278
RMN25	132	136	159	162	164	184	0	0	96	96	153	161	147	166	246	246	272	272
RMN26	136	136	162	170	183	183	0	0	94	94	155	159	149	149	0	0	0	0

RMN29	125	127	159	159	187	187	281	281	94	94	157	161	144	144	248	248	0	0
RMN33	136	143	162	164	178	184	283	283	94	94	157	166	147	147	248	248	0	0
RMN34	127	134	155	172	178	183	287	287	96	100	155	161	144	166	246	252	0	0
RMN36	117	136	164	166	178	178	0	0	94	94	151	155	144	144	0	0	0	0
RMN37	134	136	162	164	184	187	281	285	94	96	161	161	144	144	248	250	0	0
RMN38	132	138	159	161	191	193	0	0	0	0	161	161	147	153	250	250	0	0
RMN39	119	134	159	161	183	183	281	281	94	96	148	157	147	147	246	250	270	270
RMN4	132	138	166	170	180	180	0	0	94	94	157	166	144	149	248	248	0	0
RMN41	134	136	159	164	184	184	281	287	96	96	161	161	144	144	248	252	272	278
RMN42	125	127	162	162	176	180	281	281	94	94	155	159	144	166	0	0	0	0
RMN45	127	134	162	170	176	191	281	283	94	94	151	155	149	151	246	248	0	0
RMN48	129	132	159	164	180	184	285	287	94	94	157	157	147	153	246	246	0	0
RMN6	119	119	166	166	178	193	285	287	94	94	157	157	144	160	248	248	268	270
RMN8	132	136	159	164	174	183	0	0	96	96	155	155	147	166	250	250	272	272
RMN9	127	134	161	162	162	193	285	285	94	94	157	157	144	166	246	250	0	0
SL1	129	143	170	170	178	184	281	287	94	94	153	161	147	170	239	246	270	276
SL10	136	136	170	170	180	180	281	281	94	94	151	161	147	156	246	256	276	276
SL11	129	136	159	170	176	183	281	281	94	94	153	153	149	156	244	246	272	276
SL12	129	136	159	170	176	183	281	281	94	94	153	153	149	156	244	246	272	276
SL13	136	136	159	166	180	184	281	281	94	94	153	157	147	149	246	256	276	288
SL15	125	129	159	174	180	180	281	281	94	94	151	153	144	149	248	248	276	276
SL16	129	132	159	172	180	180	281	281	94	94	155	157	149	172	248	256	272	272
SL17	132	143	159	166	178	184	281	281	94	94	153	153	144	153	250	250	272	283
SL19	125	125	164	170	178	178	281	292	94	94	155	159	147	172	0	0	272	281
SL20	129	132	162	166	178	180	281	281	94	94	155	157	149	153	239	248	0	0
SL22	125	125	170	170	176	176	285	285	94	94	155	159	153	168	252	252	279	279
SL23	129	132	162	170	180	183	281	285	94	94	155	157	149	172	239	256	276	283
SL24	132	136	164	172	180	183	281	281	94	94	153	157	147	156	246	248	0	0
SL25	129	136	159	159	180	180	281	281	94	94	153	159	149	156	246	248	276	276
SL26	125	136	162	162	180	187	285	285	94	94	153	161	147	172	246	256	279	285
SL27	129	129	159	166	180	184	281	281	94	94	148	157	149	149	248	248	276	279
SL28	129	136	159	164	184	187	281	299	94	94	157	157	147	170	248	256	276	278
SL29	125	136	159	164	180	184	281	281	94	100	153	155	156	170	239	244	0	0
SL3	134	134	159	159	158	176	283	287	94	94	157	157	147	176	250	250	272	279

SL30	129	136	162	162	172	183	281	281	94	94	151	159	147	149	248	256	274	281
SL31	132	136	159	159	172	183	281	287	94	94	153	157	156	170	244	248	274	276
SL32	134	134	170	172	172	180	281	285	94	100	153	157	144	147	246	256	278	283
SL33	132	136	159	170	184	184	281	281	94	94	153	159	147	170	246	256	278	278
SL35	138	138	170	172	0	0	0	0	94	94	153	172	149	153	0	0	0	0
SL36	132	138	170	172	178	184	281	287	94	94	151	153	147	170	244	246	0	0
SL37	132	134	151	162	178	187	281	281	94	94	172	172	147	170	239	239	276	288
SL38	136	138	170	170	180	183	0	0	94	100	153	159	147	149	239	248	272	276
SL39	125	132	170	172	180	189	0	0	94	94	153	153	170	170	0	0	0	0
SL4	129	129	159	162	187	187	281	281	94	94	155	155	147	147	239	246	276	288
SL40	129	136	159	170	180	183	285	285	94	100	159	159	147	172	248	248	276	276
SL41	129	129	162	172	180	180	281	281	94	100	153	153	147	147	246	246	0	0
SL42	136	138	159	161	184	184	281	281	94	100	153	159	170	170	248	248	279	279
SL43	132	136	159	170	180	183	281	281	94	94	153	157	153	156	246	248	0	0
SL44	129	138	159	170	183	184	281	281	94	94	153	153	168	170	248	248	279	287
SL45	129	129	161	166	184	189	281	281	94	94	153	159	172	178	246	246	278	278
SL5	132	136	162	170	180	183	281	281	94	94	151	157	156	172	244	248	276	281
SL7	129	129	162	170	180	184	281	285	94	94	153	159	147	172	239	244	276	290
SL8	127	145	162	164	176	183	281	281	94	94	153	157	168	170	246	250	276	283
CR1	125	132	159	161	180	180	285	287	94	94	155	157	147	147	246	250	278	279
CR11	136	140	151	162	180	180	281	285	94	94	153	155	149	149	248	248	279	279
CR13	125	132	168	170	180	180	281	287	94	94	172	174	144	147	246	248	274	274
CR14	134	134	161	162	187	195	281	290	94	94	155	161	149	178	239	248	276	285
CR15	125	125	151	170	176	184	287	287	94	94	155	159	153	153	252	252	283	283
CR16	125	125	151	170	176	184	287	287	94	94	155	159	153	153	252	252	283	283
CR17	136	136	159	159	183	187	281	285	94	94	153	163	149	170	248	248	272	279
CR18	132	136	162	164	176	178	0	0	94	94	155	155	147	160	246	254	0	0
CR19	129	132	153	170	184	184	281	281	94	94	151	155	147	147	248	248	279	279
CR2	132	134	159	164	178	180	285	285	94	94	153	157	149	172	239	248	272	288
CR20	127	132	151	151	180	184	281	287	94	94	155	159	153	153	246	248	274	274
CR21	132	140	164	168	176	176	276	287	94	94	155	157	156	156	239	254	279	279
CR3	125	127	159	164	178	183	281	287	94	94	157	157	149	149	239	248	274	278
CR4	132	136	162	170	176	189	285	285	94	94	157	159	147	156	239	248	279	285
CR5	132	138	161	164	180	180	281	281	94	94	153	159	184	187	239	246	285	285

CR6	132	138	161	164	180	180	281	281	94	94	153	159	184	187	239	246	0	0
CR7	119	138	166	166	178	178	0	0	94	100	155	159	149	172	246	248	276	276
CR8	127	140	166	170	176	176	281	285	94	94	155	166	149	172	239	248	279	283
CR9	127	140	166	170	176	176	281	285	94	94	155	166	149	172	239	248	279	283
BH1	138	140	162	166	176	183	281	285	94	94	155	166	144	156	248	248	281	281
BH10	125	140	140	162	168	178	281	285	94	94	151	168	147	184	250	252	281	281
BH11	129	129	159	164	178	189	285	285	94	94	157	168	149	149	239	246	272	276
BH13	136	136	162	164	176	183	281	281	94	94	159	168	147	160	248	248	276	281
BH14	125	136	164	168	180	187	281	285	94	94	0	0	149	149	0	0	272	276
BH15	129	136	161	162	178	180	281	285	94	94	155	155	149	149	239	239	276	288
BH16	134	138	159	164	180	184	281	285	94	94	153	153	147	147	244	252	270	276
BH17	138	140	162	166	176	183	281	285	94	94	153	166	147	156	246	248	0	0
BH18	132	140	151	159	176	176	281	285	94	100	155	166	144	156	239	248	281	281
BH19	136	136	166	166	176	176	281	281	94	94	155	159	147	172	239	252	0	0
BH2	132	140	151	159	176	176	281	285	94	100	155	166	144	156	248	248	281	281
BH20	129	129	159	168	176	184	281	287	94	94	159	168	144	172	239	248	276	283
BH21	125	127	162	162	176	180	281	281	94	94	166	168	147	151	239	248	0	0
BH22	129	140	151	164	189	189	285	287	94	94	155	159	147	147	239	248	0	0
BH23	129	140	164	166	174	178	0	0	94	94	155	174	147	147	246	250	0	0
BH24	129	136	140	151	176	176	285	285	94	94	159	166	147	153	244	248	272	281
BH25	138	138	162	168	176	180	283	285	94	94	155	159	158	172	246	248	272	278
BH3	132	136	140	170	176	183	281	285	94	94	159	168	147	160	248	248	276	281
BH4	125	134	164	164	183	184	285	285	94	94	155	157	149	156	239	239	0	0
BH5	129	136	166	168	178	189	281	281	94	94	153	155	149	149	239	256	272	278
BH6	136	136	161	162	178	193	281	285	94	94	153	172	149	158	246	246	281	292
BH7	125	139	162	164	178	178	285	287	94	94	153	159	144	147	248	250	278	279
BH8	129	129	159	168	174	178	281	281	94	94	153	155	151	172	246	246	272	274
BH9	129	138	151	168	178	184	281	287	94	94	155	161	147	158	248	248	278	279
SR1	138	140	140	159	183	183	281	285	94	94	153	155	144	151	246	248	272	274
SR2	129	134	155	172	184	187	281	294	94	94	155	157	144	144	246	248	272	272
SR3	123	140	159	166	178	180	281	283	100	100	148	157	156	161	246	246	276	278
SR4	123	134	151	159	187	189	285	285	94	104	0	0	0	0	239	248	0	0
SR5	123	123	159	162	176	178	281	285	94	104	151	157	147	151	246	248	276	279
SR6	117	140	159	166	176	178	281	285	94	104	157	157	149	153	246	248	276	278

SR7	125	129	159	166	178	178	281	281	94	104	155	172	153	153	246	248	274	274
SR8	125	129	159	166	178	178	281	281	94	104	155	172	153	153	246	248	274	274
VOJ1	134	134	159	159	158	176	283	287	94	94	157	157	147	176	250	250	272	279
VOJ2	134	134	159	159	183	189	285	287	94	94	151	157	147	166	248	248	270	274
MN1	132	138	140	159	176	189	285	287	94	94	157	159	151	151	246	250	0	0
MN2	129	138	159	159	176	180	281	281	94	94	155	168	144	170	246	250	276	279
MN3	129	132	151	159	183	187	276	285	94	94	151	168	144	147	0	0	0	0
MN4	129	132	151	159	183	187	276	285	94	100	151	168	144	147	246	248	270	278
MN5	132	136	162	170	176	189	285	285	94	94	157	159	147	156	239	248	279	285
MN6	132	140	159	159	189	191	281	285	94	94	157	157	147	147	239	239	274	274
BLG1	136	140	151	162	174	184	281	287	94	100	151	157	147	149	239	239	278	281
BLG3	125	129	162	170	174	178	281	289	94	94	151	157	149	151	239	248	272	272
BLG4	138	138	161	166	168	189	269	276	94	94	153	155	149	168	246	248	0	0
MC1	129	129	159	164	184	184	281	281	96	96	124	168	168	168	241	241	274	274
MC10	129	129	159	168	174	178	281	281	94	94	153	155	151	172	246	246	272	274
MC11	138	140	155	164	178	187	276	283	94	100	153	155	144	149	246	248	276	278
MC12	127	132	159	159	180	184	285	287	94	94	151	159	147	176	248	248	276	276
MC14	129	129	159	164	184	184	281	281	94	94	153	161	149	170	246	246	270	272
MC16	127	140	164	164	183	184	281	281	94	94	151	161	144	156	246	248	0	0
MC18	125	136	161	164	180	189	285	285	88	94	155	155	147	147	246	248	0	0
MC4	138	143	159	164	176	187	281	285	94	94	157	159	149	161	246	256	274	274
MC5	132	134	168	168	183	184	281	283	94	94	168	168	147	172	248	248	270	274
MC6	123	127	162	164	183	184	281	283	94	94	155	159	149	156	239	248	272	276
MC7	129	138	161	166	180	187	281	283	94	100	155	157	0	0	246	248	272	274
MC8	117	138	159	159	184	187	283	287	94	100	153	155	144	174	246	256	278	281
MC9	138	143	159	164	176	187	281	285	94	100	157	159	149	161	246	256	274	274
GR19	129	134	140	159	176	184	281	285	94	100	153	163	172	174	250	256	274	281
GR20	125	125	162	166	172	172	281	285	94	94	166	168	144	174	248	248	281	281
GR54	136	138	159	159	180	184	281	281	94	94	168	170	156	156	246	246	274	276
GR86	125	138	155	161	176	183	281	289	94	100	161	161	144	144	246	246	0	0
GR87	129	138	159	159	180	180	290	292	94	100	155	157	153	156	246	246	274	278
GR79	125	140	162	164	183	191	281	281	94	94	155	155	144	149	246	248	0	0
GR80	125	132	164	168	184	189	281	285	94	94	151	155	151	151	246	248	272	276
GR89	129	129	159	159	178	180	290	290	94	94	148	155	153	153	246	246	274	276

GR90	129	132	162	164	183	184	281	281	94	94	155	163	147	176	246	248	272	274
GR34	129	136	159	161	180	180	290	290	100	100	155	157	156	158	246	246	270	276
GR35	129	134	159	161	180	180	290	292	94	100	148	155	153	158	246	260	272	276
GR37	134	134	159	162	180	183	287	290	94	100	148	155	153	158	246	246	0	0
GR42	132	134	159	159	180	183	290	290	0	0	148	155	153	153	0	0	0	0
GR43	129	134	159	159	178	180	281	290	100	100	155	155	153	153	246	246	272	272
GR47	132	134	159	159	180	180	290	292	100	100	155	155	153	153	246	246	0	0
GR48	129	129	159	159	183	184	281	292	94	100	155	155	153	156	246	246	0	0
GR50	134	138	159	159	180	183	292	292	94	94	155	163	153	153	246	246	0	0
GR51	132	134	159	161	180	183	290	290	94	94	148	155	161	161	246	246	274	274
GR52	132	134	157	159	180	184	281	281	94	94	155	155	153	153	246	246	272	276
GR56	132	134	159	161	178	180	290	290	94	100	155	157	158	161	246	246	0	0
GR62	127	134	159	159	180	180	290	290	94	94	155	155	153	168	246	246	276	276
GR66	132	134	159	159	180	183	276	292	100	100	148	155	153	153	246	246	274	279
GR67	129	138	159	159	180	187	276	292	100	100	148	155	153	153	246	246	274	276
GR68	134	136	159	164	180	180	290	290	94	94	155	155	156	156	246	246	268	270
GR69	134	134	159	159	180	184	290	294	100	100	155	155	153	158	246	246	272	276
GR74	134	134	159	159	180	180	290	290	94	94	148	148	153	153	246	246	272	276
GR77	138	140	159	159	180	180	292	292	100	100	148	155	158	158	246	246	0	0
GR78	134	136	157	159	178	180	0	0	100	100	155	155	153	153	246	246	0	0
GR81	134	136	159	159	178	183	281	290	100	100	148	148	153	153	246	246	272	272
GR82	134	134	159	159	180	180	290	292	94	94	148	155	158	158	246	246	274	274
GR83	129	134	157	159	178	180	0	0	100	100	148	148	153	153	0	0	0	0
GR88	129	143	159	172	178	183	281	283	94	100	153	166	147	156	246	246	272	272
GR94	121	123	159	159	180	183	290	290	100	100	155	155	153	153	246	246	276	276